



Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im  
Dr. von Haunerschen Kinderspital – Innenstadt  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

**Die Identifizierung von Genveränderungen im CLNS1A-Gen und deren Einfluss auf die  
Lungenfunktion und die Entstehung von Asthma bronchiale**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Anna Pieper  
aus  
Neuss

München, 2007

Mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. med. M. Kabesch
Mitberichterstatter:	PD Dr. E. Holinski-Feder Prof. Dr. R. M. Huber
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	05.07.2007

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Asthma und Allergie – häufige Erkrankungen im Kindesalter.....	1
1.1.1	Epidemiologie und klinisches Bild.....	1
1.1.2	Formen des Asthma bronchiale und Verlauf im Kindesalter .....	2
1.1.3	Diagnose und Therapie .....	5
1.1.3.1	Lungenfunktionsdiagnostik .....	5
1.1.3.2	Therapie .....	9
1.2	Pathomechanismen des Asthma bronchiale .....	9
1.2.1	Strukturzellen und Asthma .....	12
1.3	Asthmagenetik.....	14
1.3.1	Familienanamnese, Zwillingsstudien und Segregationsanalysen – .....	
	Handelt es sich bei Asthma um eine genetische Erkrankung? .....	14
1.3.2	Methoden zur Identifikation asthmarelevanter Gene .....	15
1.3.3	Stand der Forschung in der Asthmagenetik .....	17
1.3.3.1	Gene der allergischen Inflammation.....	17
1.3.3.2	Strukturgene .....	20
1.4	Auswahl von CLNS1A im Rahmen der Asthmagenetikforschung.....	25
1.5	CLNS1A – ein mögliches Kandidatengen? .....	26
1.6	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	30
2	Material und Methoden.....	31
2.1	Die Populationen.....	31
2.1.1	Die Mutations-Screening-Population .....	31
2.1.2	Die Studienpopulation für Assoziationsstudien.....	31
2.1.2.1	Querschnittspopulation München und Dresden: .....	32
2.1.2.2	Fall-Kontroll-Population (MDL 1872):.....	32
2.1.2.3	Fragebogen .....	33
2.1.2.4	Skin-Prick- Test .....	33
2.1.2.5	Spirometrie und bronchialer Reiztest .....	34
2.1.2.6	Blutprobe und deren weitere Verwendung .....	34
2.2	Material .....	35
2.2.1	Geräte.....	35
2.2.2	Computerprogramme .....	36
2.2.3	Puffer, Lösungen, Reagenzien.....	37
2.2.4	Reaktionskits.....	39
2.2.5	Enzyme .....	39
2.2.6	Primer .....	40
2.2.7	Sonstige Materialien.....	40
2.3	Methoden.....	41
2.3.1	DNA-Extraktion .....	41
2.3.2	Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen.....	41
2.3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	42
2.3.4	Nested PCR.....	44
2.3.5	Primer Extension Preamplification (PEP) .....	45
2.3.6	Gel-Elektrophorese von Nukleinsäuren in Agarose-Gelen .....	47
2.3.7	Gelextraktion .....	47
2.3.8	Aufreinigung der PCR-Produkte .....	47
2.3.9	Sequenzierung.....	48
2.3.10	Auswertung der Sequenzen .....	51
2.3.11	Genotypisierung mittels MALDI-TOF MS .....	52

2.3.11.1	Theoretische Grundlagen.....	52
2.3.11.2	Vorbereitung der Platten für die MALDI-TOF .....	53
2.3.11.3	Polymerasekettenreaktion (PCR) im Rahmen der hME-Methode .....	54
2.3.11.4	SAP-Reaktion .....	56
2.3.11.5	Primer-Extension-Reaktion .....	57
2.3.11.6	Aufreinigung der Extensionsprodukte .....	59
2.3.11.7	MALDI-TOF-Massenspektrometrie im Rahmen der hME-Methode.....	59
2.3.12	Statistik .....	60
2.3.12.1	Bilden von Haplotypblöcken.....	60
2.3.12.2	Hardy-Weinberg .....	61
2.3.12.3	Assoziation .....	61
2.3.13	Phylogenetische Analysen (VISTA Browser) .....	63
2.3.14	Analyse von Transkriptionsfaktorbindestellen (MAT-Inspector) .....	63
3	Ergebnisse .....	65
3.1	Ergebnisse des Mutationsscreenings .....	65
3.1.1	Amplifikation und Sequenzierung.....	65
3.1.2	Identifizierung von Mutationen und Polymorphismen im CLNS1A-Gen .....	66
3.1.3	Analyse des Kopplungsungleichgewichtes (Linkage Disequilibrium, LD).....	69
3.2	Ergebnisse der Genotypisierung.....	71
3.2.1	Technische Durchführung der Genotypisierung.....	71
3.2.2	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht als Qualitätskontrolle .....	73
3.3	Auswertung der Assoziationsergebnisse .....	73
3.3.1	CLNS1A und Asthma bronchiale .....	74
3.3.2	CLNS1A und Heuschnupfen.....	75
3.3.3	CLNS1A und Neurodermitis .....	75
3.3.4	CLNS1A und Reaktionen im Haut-Prick-Test (Atopisch =3mm) .....	77
3.3.5	Zusammenfassung: Assoziationen zwischen CLNS1A-Polymorphismen.....	77
3.3.6	CLNS1A und Lungenfunktionsparameter .....	78
3.3.6.1	C7624T und Lungenfunktionsparameter .....	78
3.3.6.2	C7453T und Lungenfunktionsparameter .....	81
3.3.6.3	T12777G und Lungenfunktionsparameter.....	82
3.3.6.4	Weitere Ergebnisse der Lungenfunktionsanalyse.....	82
3.3.6.5	Zusammenfassung der Ergebnisse der Lungenfunktionsanalyse .....	83
3.4	<i>In silico</i> Analysen zur Identifizierung einer potentiellen funktionellen Relevanz .....	83
3.4.1	Phylogenetische Analyse von C7624T (Vista Browser).....	84
3.4.2	<i>In silico</i> Analyse zur Untersuchung von Transkriptionsfaktorbindestellen .....	85
3.4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der <i>in silico</i> Analysen.....	86
4	Diskussion.....	87
5	Zusammenfassung .....	98
6	Summary.....	99
7	CLNS1A-Genkarte .....	100
8	Literaturverzeichnis .....	108
9	Tabellenverzeichnis .....	122
10	Abbildungsverzeichnis .....	123
11	Abkürzungsverzeichnis.....	124
12	Danksagung .....	127
13	Lebenslauf.....	128

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Asthma und Allergie – häufige Erkrankungen im Kindesalter

#### 1.1.1 Epidemiologie und klinisches Bild

Asthma bronchiale ist die häufigste chronische Erkrankung im Kindesalter. Betroffen sind etwa 8-10% der Kinder in Deutschland (VON MUTIUS 1994), wobei in den letzten Jahrzehnten eine steigende Prävalenz zu verzeichnen war (ISAAC 1998; VON MUTIUS et al. 1998). Bis zum Ende der Pubertät ist das männliche Geschlecht etwa doppelt so häufig wie das weibliche betroffen. Im späteren Leben gleicht sich dieser Unterschied annähernd aus (DWORKIN 2000). Weltweit schwankt die Häufigkeit von Asthma bronchiale ganz erheblich zwischen 2% und 20% je nach sozioökonomischen Lebensbedingungen (Lifestyle Faktoren) und ethnischer Herkunft (SPEER und GAHR 2001).

Definiert ist Asthma als eine chronische Erkrankung der Bronchien mit variabler, vorwiegend anfallsweise auftretender und reversibler Atemwegsobstruktion infolge Kontraktion der glatten Bronchialwandmuskulatur, erhöhter Mukusproduktion und entzündlich ödematöser Schwellung der Mukosa. Charakteristisch für Asthma bronchiale ist eine bronchiale Hyperreaktivität, womit eine gesteigerte Empfindlichkeit des Bronchialsystems auf eine Vielzahl von exogenen und endogenen Reizen gemeint ist.

Der Asthmaanfall beginnt bei Kindern in der Regel mit einem trockenen Reizhusten, der akut oder schleichend einsetzen kann. Häufig wird zusätzlich ein Engegefühl in der Brust beschrieben. Besonders kennzeichnend ist die forcierte und verlängerte Expiration, die sich bis zur bedrohlichen Dyspnoe und - besonders bei sehr kleinen Kindern - Tachypnoe steigern kann. Der Thorax des Patienten ist überbläht und die heftigen Atemanstrengungen führen zu interkostalen, jugulären und epigastrischen Einziehungen bei der Einatmung. Auskultatorisch kann ein massives „Giemen“, „Pfeifen“ und „Brummen“ über beiden Lungenfeldern wahrgenommen werden. Eindrucksvoll ist der hypersonore bis tympane Klopfeschall infolge der starken thorakalen Blähung. Die Patienten reduzieren jegliche körperliche Aktivität und stützen oft zur Fixierung des Schultergürtels die Arme auf, um den Einsatz der Atemhilfsmuskulatur zu ermöglichen. Häufig beobachtet man die Zuhilfenahme der sog. Lippenbremse zur Minderung des expiratorischen Bronchialkollapses. Kommt es zur Hyperventilation des Patienten, so treten sowohl eine Hypoxämie als auch eine Hypokapnie

auf. Bei schweren Anfällen ist eine Hyperkapnie auf Grund der Atemdekomensation mit Hypoventilation nachweisbar (MUNTAU 1994; SPEER und GAHR 2001; KOLETZKO 2004). Meist wird ein Asthmaanfall von Angstzuständen und einer Tachykardie begleitet, bedingt durch emotionalen Stress und die bereits beschriebene Kohlendioxidretention.

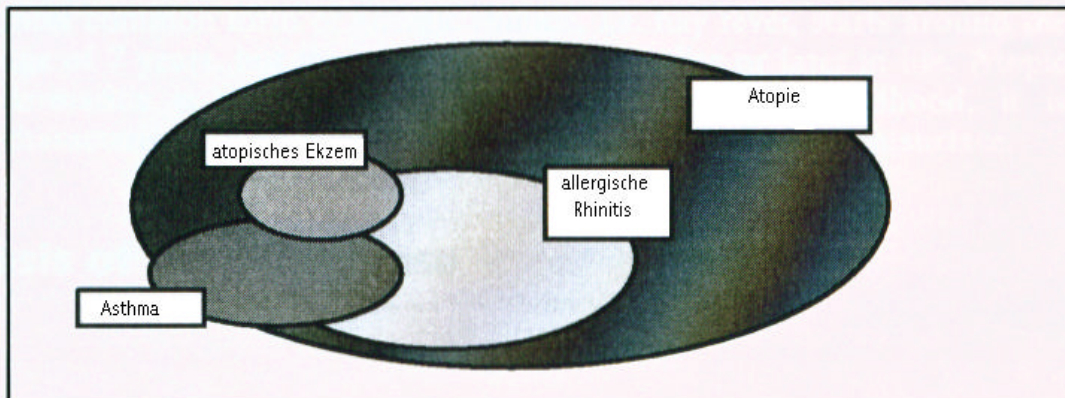
Typischerweise handelt es sich beim Asthmaanfall um nur kurze Anfälle von Minuten bis Stunden, und der Patient erscheint danach klinisch wieder völlig gesund. Auch zwischen den einzelnen Asthmaanfällen sind die Patienten meist symptomfrei. Durch zirkadiane vagale Einflüsse kommt es besonders in den frühen Morgenstunden zwischen 3 und 5 Uhr zu Asthmaanfällen (GREVERS und RÖCKEN 2001).

Mit Fortschreiten der Erkrankung können auch Phasen länger andauernder Atemobstruktion auftreten. Ein Anfall, der über 24 Stunden anhält und in dieser Zeit nicht auf adäquate Therapie anspricht, wird definitionsgemäß als ein Status asthmaticus bezeichnet (SPEER und GAHR 2001).

### 1.1.2 Formen des Asthma bronchiale und Verlauf im Kindesalter

Asthma bronchiale gehört wie die allergische Rhinitis und die Neurodermitis zum heterogenen Formenkreis der atopischen Erkrankungen (Abb.1).

**Abbildung 1: Die phänotypische Heterogenität der Atopie (nach Feijen et al.)**



Je nachdem, ob bei der Auslösung des asthmatischen Geschehens ein allergischer Mechanismus beteiligt ist, unterscheidet man eine extrinsische und eine intrinsische Form sowie eine Mischform des Asthma bronchiale. Das exogen-allergische Asthma bronchiale zeichnet sich durch eine überschießende Immunantwort des IgE-Systems (Typ-I-Allergie) aus. Die allergische Reaktion stellt hier die alleinige Ursache der Symptome dar. Betroffene Patienten weisen oftmals eine eigene oder familiäre Anamnese allergischer Erkrankungen auf, verbunden mit einem erhöhten IgE-Serumspiegel und einer positiven Hautreaktion im Prick-

Test (Quaddelbildung und Rötung nach intrakutaner Injektion von Extrakten von aerogenen Antigenen), sowie einer positiven Reaktion auf Provokationstests (Inhalation von spezifischen Antigenen). Häufige Allergene in Europa sind Gräser und Pollen, Hausstaubmilben und Tierepithelien (DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ALLERGOLOGIE UND KLINISCHE IMMUNOLOGIE (DGAI) und (DAAU) 2004).

Bei der intrinsischen Form, auch endogenes Asthma genannt, fehlt jeglicher Hinweis auf eine allergische Ursache. Oft lässt sich für die Hyperreagibilität der Bronchien keine erklärbare Ursache finden. Der Auslöser des asthmatischen Geschehens ist hier meist eine Virusinfektion (RS-Virus, Parainfluenzavirus, Influenzavirus) oder es gibt andere Triggermechanismen, wie Kaltluft, Staub, Tabakrauch, körperliche Anstrengung oder emotionaler Stress (ROMANET-MANENT et al. 2002). Die intrinsische Form von Asthma macht etwa 10% im Kindesalter aus.

Die häufigste Asthmaform bei Kindern ist die Mischform, bei der allergische Mechanismen als auch andere Faktoren zur Anfallsauslösung führen (ca. 65%). Insgesamt kann bei kindlichen Asthmatikern von einer allergischen Mitbeteiligung von bis zu 85% ausgegangen werden (PEARCE et al. 1999; ROMANET-MANENT et al. 2002).

Mehr als die Hälfte aller Ersterkrankungen an Asthma fällt in das Kindesalter. Bei 80% der kindlichen Asthmatiker manifestiert sich die Erkrankung bis zum ersten Schuljahr, bei 45% bereits im ersten Lebensjahr. Jedoch entwickelt sich nicht jede obstruktive Bronchitis in den ersten drei Lebensjahren zu einem manifesten Asthma bronchiale. Nur etwa 30% der Säuglinge mit rezidivierenden obstruktiven Bronchitiden zeigen später Symptome eines manifesten Asthma bronchiale. STEIN et al. betrachten eines der Hauptsymptome des Asthma bronchiale, das „pfeifende Atemgeräusch“ oder „Giemen“ im Kindesalter, näher und unterscheiden aufgrund ihrer Ergebnisse drei verschiedene Phänotypen:

Im frühen Kindesalter beobachten sie das vorübergehende, frühe Giemen während der ersten drei Lebensjahre, welches offenbar unabhängig von einer Hyperreaktivität der Luftwege ist. Vielmehr scheinen mechanische Ursachen wie veränderte Atemwegswiderstände und variable Lungencompliance der Grund der verminderten Lungenfunktion zu sein.

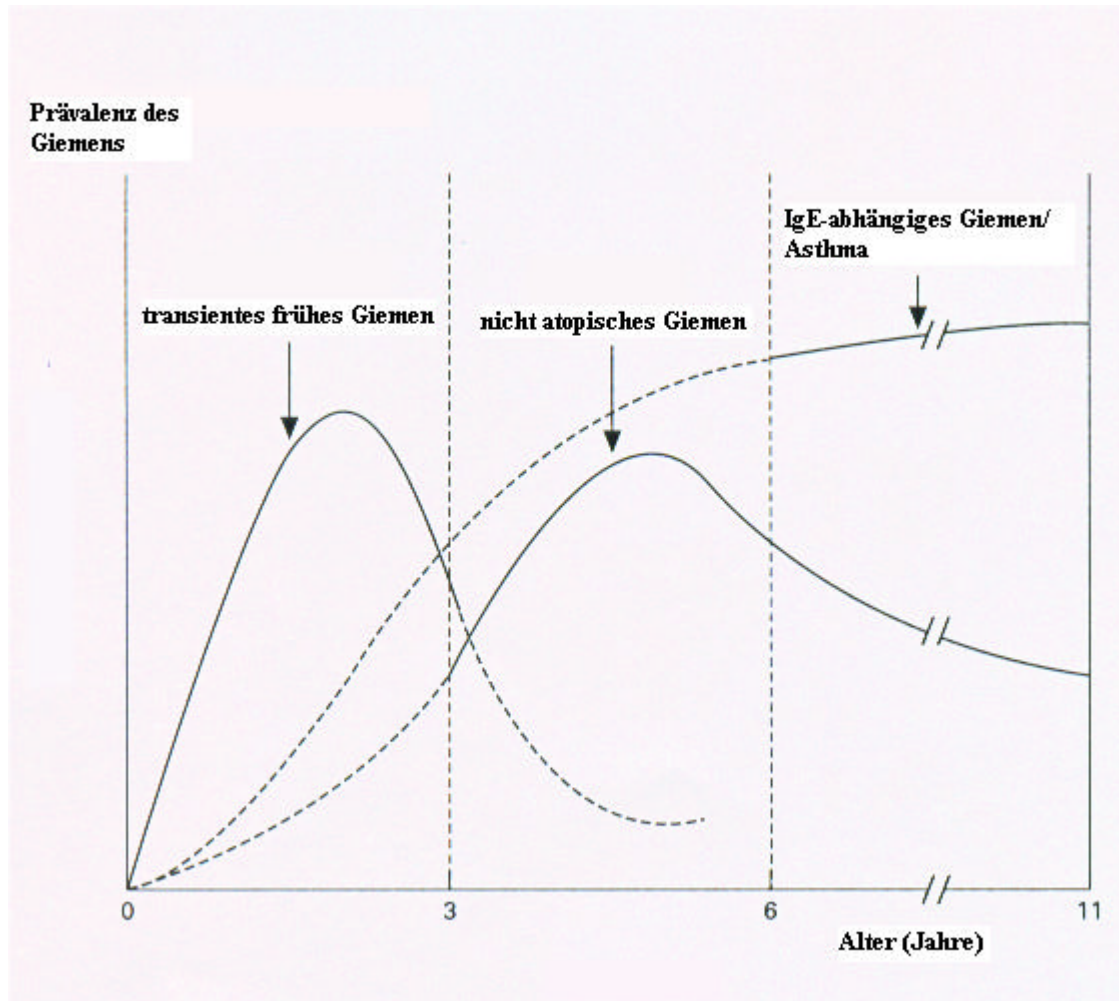
Die zweite Gruppe stellen Patienten dar, die anamnestisch während des Klein- und Vorschulkindalters ein pfeifendes Atemgeräusch gezeigt haben. Peak-flow-Messungen mehrere Jahre nach Abklingen dieses Symptoms zeigen zwar eine gewisse Variabilität, jedoch kann kein Ansprechen im Metacholin-Test beobachtet werden. Dieses Phänomen bezeichnen STEIN et al. als nicht-atopisches Giemen.



## EINLEITUNG

Der eigentliche Asthmapatient („IgE-abhängiges Giemen“) „giemt“ in jeder Altersklasse und zeichnet sich durch ein positives Ansprechen im Metacholin-Test, variablen Peak-Flow und einer atopischen Reaktion (positiver Hauttest und erhöhte IgE-Spiegel) aus (STEIN et al. 1997).

Abbildung 2: Erscheinungsformen des Giemens in Abhängigkeit vom Alter (nach STEIN et al.)



### 1.1.3 Diagnose und Therapie

Die Diagnose des Asthma bronchiale wird anhand der Anamnese, des typischen klinischen Bildes und des Nachweises einer reversiblen Bronchialobstruktion in der Lungenfunktionsanalyse gestellt. Die Bestimmung der Lungenfunktion ist mit geeigneten Messgeräten bereits im Säuglingsalter (Babylethysmograph) und ab dem 4. Lebensjahr mit Spirometern oder besser mit einem Ganzkörperplethysmographen bei kooperativen Kindern möglich. Somit können bereits im frühen Kindesalter Aussagen über Atemfluss und Atemvolumina sowie über Störungen innerhalb und außerhalb der Lunge, die einen Einfluss auf die Lungenvolumina ausüben, getroffen werden.

#### 1.1.3.1 Lungenfunktionsdiagnostik

Die Lungenfunktionsdiagnostik ist für die Diagnose des Asthma bronchiale wichtig, da sich so feststellen lässt, ob der Atemfluss durch eine Verengung der Bronchien gestört ist und welche Art der Ateomeinschränkung genau vorliegt. Bei Asthma bronchiale ist besonders die Expiration behindert, so dass sich das Bild einer obstruktiven Lungenerkrankung präsentiert. In der Lungenfunktion ist daher besonders die Ausatemkapazität (die Luftmenge, die der Patient mit aller Kraft und möglichst schnell ausatmen kann) und das Residualvolumen von Interesse. Neben der Diagnostik bietet die Lungenfunktion auch die Möglichkeit, eine „Bestandsaufnahme“ der Lunge zu machen, auf die man sich in späteren Kontrolluntersuchungen beziehen und an der der Erfolg der Behandlung gemessen werden kann.

Grundsätzlich unterscheidet man bei der Lungenfunktionsprüfung die statische Spirometrie, mit der das ventilierbare Lungenvolumen bestimmt wird, und die dynamische Spirometrie, die das Verhältnis zwischen Atemvolumen und Zeit bzw. zwischen Atemvolumen und Atemfluss wiedergibt.

Im Rahmen der statischen Spirometrie werden die ventilierbaren Lungenvolumina Vitalkapazität (VC), Atemzugvolumen (VT) und in- bzw. expiratorische Reservevolumina gemessen. Das Atemzugvolumen wird in Ruhe beim völlig entspannten Kind bestimmt, wobei aus mindestens 10 Atemzügen der Mittelwert bestimmt wird. Das Atemminutenvolumen ergibt sich aus der Summe aller Atemzüge innerhalb einer Minute. Das Verhältnis von Inspirationszeit zu Expirationszeit ergibt den Atemzeitquotienten. Er beträgt bei kleinen Kindern 1:1,3 und bei Jugendlichen 1:1,5 bis 1:2. Bei einer Atemwegsobstruktion wie dem Asthma bronchiale ist das Atemzugvolumen eher größer bei gleichzeitig erniedrigter Atemfrequenz und verlängertem Atemzeitquotienten.

Im Folgenden werden die in der Lungenfunktionsdiagnostik bestimmten Lungenvolumina vorgestellt. Graphisch dargestellt sind diese auch in Abb. 3:

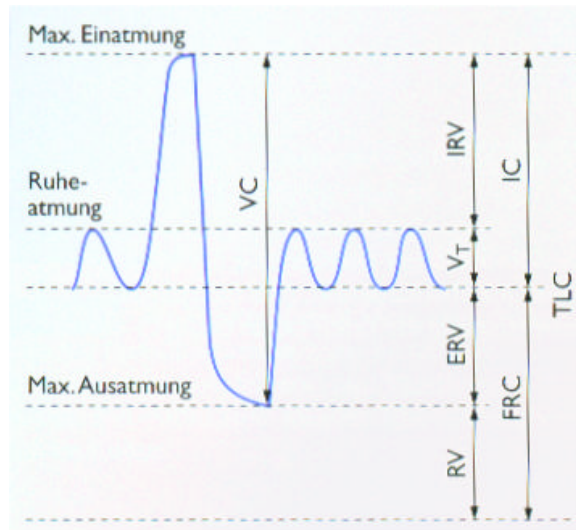
Die Vitalkapazität (VC) setzt sich zusammen aus dem expiratorischen Reservevolumen und der inspiratorischen Kapazität ( $VC=ERV+IC$ ). Die Bestimmung der Vitalkapazität bei Kindern und Jugendlichen kann je nach Mitarbeitsbereitschaft während forcierter Ausatmung nach tiefer Einatmung (FVC), während langsamer maximaler Einatmung nach tiefer Ausatmung (IVC) oder während langsamer maximaler Ausatmung nach tiefer Einatmung (EVC) gemessen werden.

Als funktionelle Residualkapazität (FRC) bezeichnet man das Volumen, das am Ende einer normalen Ausatmung in der Lunge verbleibt. Sie setzt sich zusammen aus dem expiratorischen Reservevolumen (ERV, Restvolumen bis zur maximalen Ausatmung) und dem Residualvolumen (RV), der Luft, die nach maximaler Expiration nicht mehr ausgeatmet werden kann. Die funktionelle Residualkapazität kann mit Heliumgas und einem Glockenspirometer, mit einem Ganzkörperplethysmographen oder mit Hilfe der Stickstoffauswaschmethode bestimmt werden. Die Messung mit Helium oder Stickstoff erfasst die aktuell an der Atmung teilnehmenden Lungenabschnitte, der Ganzkörperplethysmograph bestimmt zusätzlich das Volumen von momentan verlegten Atemwegen. Aus der Differenz beider Messwerte kann das Volumen der „gefangenen Luft“ oder der „trapped air“ bestimmt werden. „Air trapping“ wird typischerweise bei Kindern mit Asthma bronchiale oder Mukoviszidose beobachtet.

Die totale Lungenkapazität (TLC) setzt sich aus der funktionellen Residualkapazität (FRC) und der inspiratorischen Kapazität (IC) bzw. aus dem Residualvolumen (RV) und der Vitalkapazität (VC) zusammen. Beim Vorliegen von „trapped air“ wird die TLC mit dem Ganzkörperplethysmographen größer angegeben als mit der geschlossenen Spirometrie. Mit der relativen funktionellen Residualkapazität ( $FRC/TLC$ ) und dem relativen Residualvolumen wird beim Erwachsenen das Ausmaß einer Lungenüberblähung beschrieben. Kinder können jedoch das Residualvolumen (RV) nur unzureichend reproduzieren. Eine Überblähung bei Kindern wird deshalb besser mit dem Verhältnis  $FRC/TLC$  angegeben.

Neben dem bereits erwähnten Phänomen des Air trapping ist bei einer obstruktiven Lungenerkrankung wie dem Asthma das Atemniveau während ruhiger Ausatmung auf Grund des vergrößerten Residualvolumens (RV) erhöht. Das Atemzugvolumen ist dabei erniedrigt, da bei der Inspiration die Obergrenze der Lungendehnbarkeit frühzeitig erreicht wird.

**Abbildung 3: Spirogramm. Schematische Darstellung der Lungenfunktionsparameter:** VC=Vitalkapazität, IRV=inspiratorische Vitalkapazität, VT=Atemzugvolumen, ERV=expiratorisches Reservevolumen, RV=Residualvolumen, IC=inspiratorische Kapazität, FRC=funktionelle Residualkapazität, TLC=totale Lungenkapazität (aus ZIMMERMANN, Atemwegserkrankungen im Kindesalter)



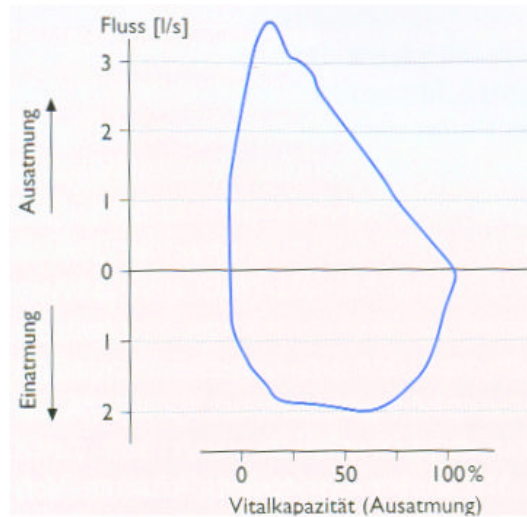
Mit Hilfe der dynamischen Spirometrie lassen sich obstruktive Ventilationsstörungen hervorragend erfassen. Mit der Volumen-Zeit-Kurve oder dem Fluss-Volumen-Diagramm bekommt man wichtige Informationen über das Ausmaß und die Lokalisation einer Obstruktion (Schleimhautödem, Fremdkörper im Bronchialsystem etc.).

Die Einsekundenkapazität (FEV1) beschreibt das forcierte Ausatemvolumen nach maximaler Inspiration innerhalb einer Sekunde. Die FEV1 ist beim Erwachsenen ein Maß für die Obstruktion der Atemwege. Bei Kindern ist insbesondere im beschwerdefreien Intervall die Bestimmung des Atemwegswiderstandes mit dem Ganzkörperplethysmographen jedoch günstiger auf Grund der geringeren Sensitivität von FEV1. Die FEV1 gilt als der am besten reproduzierbare Parameter einer bronchialen Obstruktion. Bei guter Kooperation wird ein Atemvolumen von 80% und mehr in der ersten Sekunde ausgeatmet. Liegt das ausgeatmete Volumen unter 75%, weist dies auf eine signifikante Obstruktion hin.

Im Rahmen der dynamischen Spirometrie zeigt das Fluss-Volumen-Diagramm den maximalen Atemfluss bei unterschiedlichen Lungenvolumina an (siehe Abb. 4). Von der maximalen expiratorischen Fluss-Volumen-Kurve werden folgende Messpunkte bestimmt: Der Spitzenfluss (peak flow; PEF), der mittlere expiratorische Fluss bei 75%, 50% und 25% der Vitalkapazität (MEF 25, 50, 75% VC) und der mittlere maximale expiratorische Fluss zwischen 75% und 25% der expiratorischen Vitalkapazität. Sowohl die Analyse einzelner Messwerte als auch die Betrachtung des gesamten Kurvenverlaufes sind für die Beurteilung

der momentanen Lungenfunktion wesentlich. So zeigt der Kurvenverlauf bei Kindern mit obstruktiven Ventilationsstörungen konkave Veränderungen, die auch im beschwerdefreien Intervall auf eine intrathorakale Obstruktion der Atemwege hinweisen.

**Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Fluss-Volumen-Diagramms. PEF=expiratorischer Spitzenfluss, MEF75, 50, 25 = maximaler expiratorischer Fluss bei 75, 50, 25% der Vitalkapazität (aus ZIMMERMANN, Atemwegserkrankungen im Kindesalter)**



Von den maximalen Flussgeschwindigkeiten wird der MEF25% als wichtigster Messpunkt angesehen, da hier die Flussgeschwindigkeit am wenigsten von der Stärke der Ausatmung und somit von der Mitarbeit des Kindes abhängig ist. Der maximale Fluss und der forcierte Atemstrom bei 75% der Vitalkapazität (MEF75) zeigt die Situation in den größeren Atemwegen an, der Atemstrom bei 50% und bei 25% der Vitalkapazität (MEF50, MEF25) geben die Durchlässigkeit der kleineren Atemwege an.

Die Messung des expiratorischen Spitzenflusses (PEF) mittels Peakflow-Meter ist mit geringem technischen Aufwand auch zu Hause durchführbar, jedoch ist diese Auskunft über die Obstruktion in den zentralen Atemwegen ebenfalls stark von der Mitarbeit des Kindes abhängig. Beurteilt werden die tageszeitlichen Schwankungen, der Unterschied von Tag zu Tag und der Langzeittrend. Eine Variabilität des PEF von  $>15\%$  lässt auf eine Hyperreagibilität der Bronchien schließen. Die Registrierung des PEF sollte während der Diagnostik, aber auch während einer Therapieumstellung und zur Erfassung von Exazerbationen und schweren Verläufen erfolgen.

Ist im Rahmen der Asthma-Diagnostik direkt keine Bronchialobstruktion in der Lungenfunktionsprüfung nachweisbar, so wird eine unspezifische bronchiale Provokation unter Verwendung von Pharmaka (z.B. Metacholin) oder physikalischen Reizen (z.B. Kaltluft) zum Nachweis oder Ausschluss einer bronchialen Hyperreaktivität durchgeführt.

Besteht bereits bei der Ausgangsmessung eine Bronchialobstruktion, so wird durch Inhalation eines Beta-2-Sympathomimetikums versucht, eine Broncholyse herbeizuführen. Bei reversibler Obstruktion bzw. einer Zunahme des forcierten expiratorischen Volumens in der ersten Sekunde (FEV1) um mindestens 15 % und entsprechender Klinik gilt die Diagnose eines Asthma bronchiale als nachgewiesen.

Als weitere Verfahren in der Allergiediagnostik bei Asthma dienen der Hauttest und die Messung von Gesamt-IgE und spezifischem IgE im Serum.

### **1.1.3.2 Therapie**

Bei der Therapie des Asthma bronchiale wird versucht, die Anfallshäufigkeit zu reduzieren, die bronchiale Hyperreaktivität zu dämpfen und Spätschäden wie ein Lungenemphysem zu verhindern. Um diese Ziele zu erreichen, stehen an erster Stelle die Allergenkarenz sowie die Meidung inhalativer Noxen und bronchokonstriktorisch wirkender Substanzen. Medikamentös werden Glukokortikoide, Beta-2-Sympathomimetika, Theophyllin, Mastzellstabilisatoren und Leukotrienantagonisten mit antiinflammatorischer und bronchodilatatorischer Wirkung teils oral, teils inhalativ verabreicht. Der Einsatz der verschiedenen Medikamente und deren Kombination orientieren sich am Schweregrad der Erkrankung und den bestehenden Lungenfunktionseinschränkungen. Auch eine spezifische Immuntherapie in Form einer sogenannten Hyposensibilisierung ist möglich (GREVERS und RÖCKEN 2001).

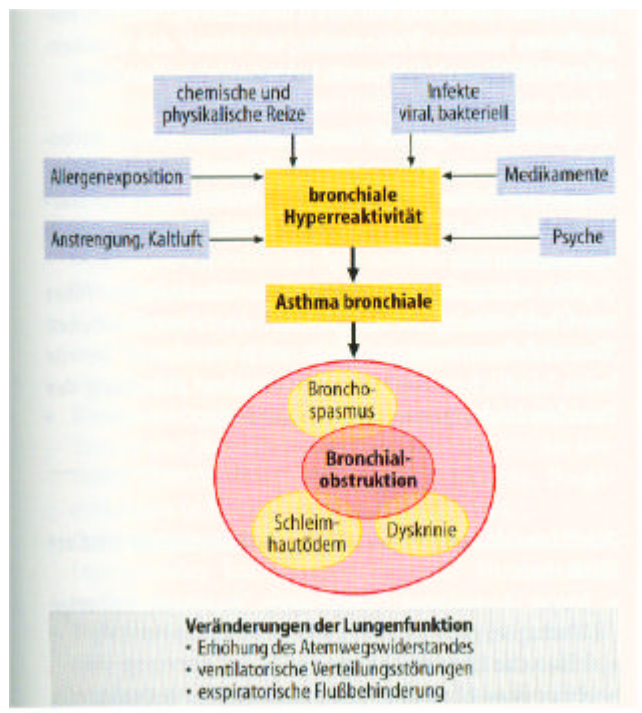
## **1.2 Pathomechanismen des Asthma bronchiale**

Die Atemnot eines Asthmapatienten kommt über eine Strömungsbehinderung durch Obstruktion in den Atemwegen bei der Expiration zustande. Diese wird verursacht durch Kontraktion der glatten Bronchialmuskulatur, durch Hyperämie, Ödem und entzündliche Infiltration der Schleimhaut sowie eine durch erhöhte Mukusproduktion verursachte Verlegung der Atemwege. Das Ausmaß dieser Bronchialobstruktion wird in der Lungenfunktionsprüfung durch eine erniedrigte FEV1 und FVC sowie durch ein vergrößertes Residualvolumen deutlich.

Allen Asthmaformen liegt eine pathogenetisch wenig geklärte Überempfindlichkeit der Atemwege zugrunde, die sich auf dem Boden einer Entzündung und Eosinophileninfiltration der Bronchialschleimhaut entwickelt. Diese eosinophile Bronchitis mit entzündlichem Ödem der Bronchialwand wird als histopathologisches Korrelat des Asthma bronchiale angesehen. So finden sich auch in der bronchioalveolären Flüssigkeit von Asthmatikern vermehrt

Mastzellen und Eosinophile. Neben einer verdickten Basalmembran und einer Hypertrophie der Bronchialdrüsen, die gemeinsam mit den vermehrt auftretenden Becherzellen eine große Menge an zähem Sekret produzieren (Hyper- und Dyskrinie), kann an weiteren histomorphologischen Veränderungen ein Epithelschaden mit entsprechender Störung der mukoziliären Clearance und die Hypertrophie der glatten Bronchialmuskulatur als Zeichen des Bronchobronchiolospasmus beobachtet werden (FAUCI et al. 1999; RIEDE und SCHAEFER 1999). Zur Veranschaulichung von Auslösung und Pathophysiologie eines Asthmaanfalls siehe Abb.5.

**Abbildung 5: Auslösung und Pathophysiologie des Asthmaanfalls (aus SPEER, GAHR, Pädiatrie)**



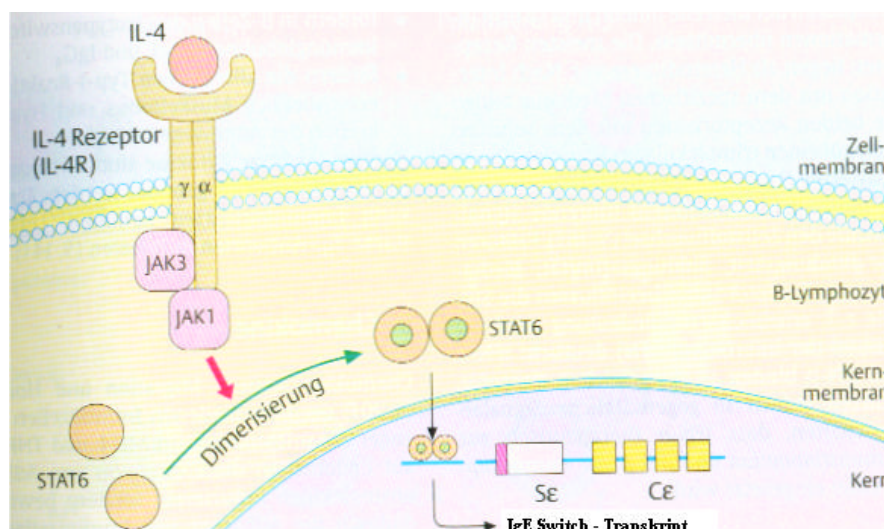
Auf molekularer Ebene beginnt die Immunpathogenese des allergischen Asthma bronchiale nach heutiger Vorstellung mit der Aufnahme des Allergens durch spezialisierte antigenpräsentierende Zellen, den dendritischen Zellen, die sich u.a. im Flimmerepithel der pulmonalen Schleimhaut befinden (HOLT und UPHAM 2004). Durch Interaktion zwischen Allergen, antigenpräsentierenden Zellen und naiven T-Lymphozyten kommt es zur Aktivierung und Differenzierung dieser Lymphozyten zu sogenannten THelfer-Zellen des Typs 2 (TH-2), welchen eine entscheidende Rolle in der Entstehung allergischer Erkrankungen zugeschrieben wird. Man geht davon aus, dass bei Allergikern ein Ungleichgewicht innerhalb der T-Helferzellen mit einem Überwiegen der TH-2-bei gleichzeitig abgeschwächter TH-1-Reaktion besteht (ROMAGNANI 1992). TH-2-Zellen sind durch die Freisetzung eines spezifischen Zytokinmusters charakterisiert: Interleukin-4 (IL-4),



IL-5, IL-9 und IL-13 sind als TH-2-typische Zytokine bekannt, wobei IL-4 und IL-13 die Aktivierung und Entwicklung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen sowie deren spezifische Immunglobulin (Ig) -Produktion regulieren (ROBINSON 2000). Durch Bindung an den membranständigen IL-4- bzw. IL-13-Rezeptor wird über die Januskinasen (JAK) JAK1 und JAK3 das Signal an intrazelluläres STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6) weitergeleitet (Abb. 6), welches dann den Klassenwechsel von IgM zu IgE in B-Zellen initiiert (SHIRAKAWA et al. 2000). Das so durch Plasmazellen sezernierte IgE wird im Folgenden an der Oberfläche von Mastzellen gebunden, so dass bei Allergenkontakt zwei benachbarte IgE-Moleküle vernetzt werden. Dieses sogenannte „bridging“ führt in Mastzellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten zur Degranulation. Die freigesetzten Mediatoren Histamin, Bradykinin, die Leukotriene C, D und E, der plättchenaktivierende Faktor (PAF) sowie die Prostaglandine E<sub>2</sub>, F<sub>2a</sub> und D<sub>2</sub> bewirken eine starke inflammatorische Sofortreaktion mit der bereits beschriebenen Bronchokonstriktion, Gefäßstauung und Ödembildung. Dies äußert sich beim Patienten mit der bekannten Klinik und den typischen Befunden in der Lungenfunktionsprüfung.

Neben ihrer Eigenschaft, eine ausgedehnte Kontraktion der glatten Atemmuskulatur und ein Mukosaödem hervorzurufen, sind die Leukotriene möglicherweise auch für weitere pathophysiologische Asthmazeichen, wie etwa gesteigerte Mukusbildung und eingeschränkten mukoziliären Transport, verantwortlich. Diese lokale Entzündungsreaktion kann von einer chronischen Spätreaktion abgelöst werden. Das ebenfalls durch TH-2-Lymphozyten sezernierte IL-5 bewirkt als chemotaktischer Faktor, dass eosinophile Granulozyten aus der Blutbahn in die Bronchialwand infiltrieren und dort durch Freisetzung weiterer Mediatoren die Entzündungsreaktion unterhalten (KAY 2000).

**Abbildung 6: IgE-Produktion: Regulation durch Zytokine (aus GREVERS, RÖCKEN: Taschenatlas der Allergologie)**





### 1.2.1 Strukturzellen und Asthma

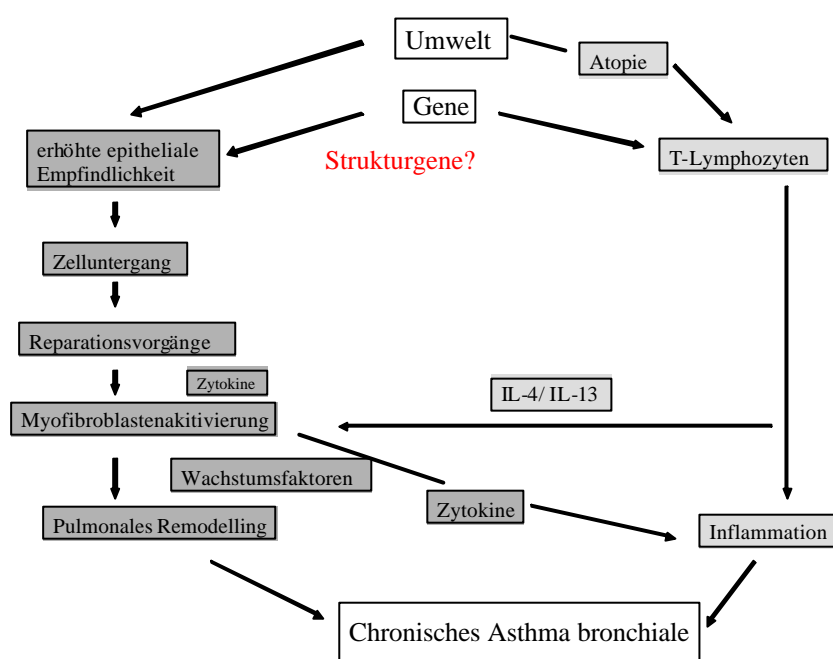
Die Anwendung und die verzeichneten Erfolge entzündungshemmender Therapiestrategien zeigen, dass der immunologische Ansatz zur Klärung der Ätiologie des Asthma bronchiale zweifellos eine zentrale Rolle spielt. Jedoch existiert eine gewisse Zahl an chronischen Asthma-Patienten, die aus der antiinflammatorischen Therapie kein Benefit ziehen. Ebenfalls weiß man mittlerweile, dass die bei Asthmapatienten beobachteten pulmonalen Umbauprozesse im Sinne eines pulmonalen Remodelings, verbunden mit Epithelzellhyperplasie und –metaplasie, Verdickung der Lamina reticularis, Hyperplasie der glatten Bronchialmuskulatur und Proliferation pulmonaler Blutgefäße und Nerven, sehr früh oder bereits vor der eigentlichen Manifestation der Asthmaerkrankung nachgewiesen werden können. Auch die Wirkung von unterschiedlichen Umwelteinflüssen auf die Entstehung von Asthma bronchiale ist bekannt. Aus all diesen Beobachtungen ergeben sich neue Erklärungsversuche in Bezug auf Ätiologie von bronchialer Hyperreaktivität (BHR) und Asthma bronchiale (DAVIES et al. 2003; HOLGATE et al. 2004):

Als eine Grenzfläche zur externen Umwelt besitzt das bronchiale Epithel eine wichtige Barrierefunktion und befindet sich damit in einer Schlüsselposition im Hinblick auf „Gen-Umwelt-Interaktionen“. Hinweise häufen sich, dass das Bronchialepithel von Asthmapatienten sowohl strukturelle als auch funktionelle Abnormalitäten wie eine erhöhte Permeabilität aufweisen. So können Umwelteinflüsse wie Oxidantien vermehrt schädlich auf das pulmonale Epithel einwirken und Zelluntergang hervorrufen. Ausgelöst dadurch wird die Expression bestimmter Gene (Wachstumsfaktoren, Zytokine) gesteigert, und es kommt vor allem durch die Aktivierung und Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten zu Umbauprozessen in der Lunge, dem sogenannten pulmonalen Remodeling. Zytokine der Th2-Inflammation (IL-4 und IL-13) sind ebenfalls in der Lage, Einfluss auf Myofibroblasten-Aktivierung zu nehmen (siehe Abb.7). Man kann sich vorstellen, dass die Interaktion von IL-4 und IL-13 mit Zellen des bronchialen Epithels eine chronische Entzündungsreaktion und das oben erwähnte pulmonale Remodeling verstärken. DAVIES et al. gehen daher von zwei parallel ablaufenden Pathomechanismen des Asthma bronchiale aus: Das Zusammenwirken von Epithelschaden auf der einen und Th2-Zytokinen auf der anderen Seite verursacht eine funktionelle Störung im bronchialen Epithel, welche über Aktivierung von Myofibroblasten Entzündung und pulmonales Remodeling zur Folge hat. Somit würden strukturelle Abnormalitäten Hand in Hand mit der Th2-Inflammation gehen. Für die organspezifische Ausprägung von Asthma scheint demnach neben einer atopischen Prädisposition das

Vorhandensein pulmonaler Strukturveränderungen wichtig zu sein, während Atopie durchaus auch ohne die Erscheinung von Asthma bronchiale auftreten kann.

Ursachen für die gestörte pulmonale Barrierefunktion und die beobachtete gesteigerte Empfindlichkeit der Asthmatikerlunge auf Umwelteinflüsse sind zurzeit nicht vollständig geklärt. Veränderungen in unterschiedlichen pulmonalen Strukturgenen (ADAM33, CC16, siehe 1.3.3.2) werden eine gewisse Rolle zugesprochen.

**Abbildung 7: Pathogenese Asthma bronchiale: Die Interaktion zwischen Th2-Inflammation und pulmonalen Epithel vor dem Hintergrund der Gen-Umwelt-Interaktion (modifiziert nach DAVIES et al.)**



In den vergangenen Jahren wurden große Fortschritte im Bezug auf das Verständnis metabolischer und biochemischer Funktionen von Epithelzellen gemacht. Als Folge davon wurde die traditionelle Betrachtungsweise des Epithels als eine rein passive Barriere zur externen Umwelt von dem Konzept abgelöst, dass das pulmonale Epithel vielmehr eine wichtige und aktive Rolle in der Initiierung und Aufrechterhaltung chronischer Entzündung der Luftwege spielt (POLITO und PROUD 1998; HOLGATE et al. 1999). In verschiedenen Studien wurde bereits gezeigt, dass pulmonale Epithelzellen in der Lage sind, eine Vielzahl von Molekülen zu exprimieren, die im engen Zusammenhang mit Inflammation und Immunität stehen: MHC-Klasse I (GLANVILLE et al. 1989; PAPI et al. 2000), CD40 (PROBST et al. 2000), Adhäsionsmoleküle (BENTLEY et al. 1993; ATSUTA et al. 1997; STRIZ et al. 1999) und eine große Anzahl an Zytokinen und Chemokinen (STANDIFORD et al. 1990; STELLATO et al. 1995; SCHWIEBERT et al. 1996; POLITO und PROUD 1997; HOLGATE et al. 1999). Zusätzlich scheinen Epithelzellen der Luftwege in bestimmten

Situationen auch als Antigen-präsentierende Zellen fungieren zu können, da auf ihrer Oberfläche MHC-II-Moleküle gefunden wurden (GLANVILLE et al. 1989; KALB et al. 1991; MEZZETTI et al. 1991). Kurosawa et al. konnten nachweisen, dass diese Zellen das costimulierende Molekül B7-H2 exprimieren, was die Vermutung einer Antigen-präsentierenden Funktion unterstreicht (KUROSAWA et al. 2003).

Neben dem pulmonalen Epithel sind auch die glatten Muskelzellen der Bronchialwand immer mehr in das Interesse der Forschung gerückt. Sie, die den Haupteffekt auf den Bronchialwandtonus haben, wurde lange Zeit lediglich als passive Zielzellen für Mediatoren von Leukozyten und anderen Entzündungszellen gesehen (PANETTIERI 2002). Nun wird ihnen jedoch auch eine modulierende Wirkung auf Entzündungsvorgänge in den Luftwegen zugesprochen. Dies soll ähnlich dem pulmonalen Epithel über die aktive Sekretion von Zytokinen und Chemokinen sowie über die Expression von Adhäsionsmolekülen geschehen (HOWARTH et al. 2004; LAZAAR und PANETTIERI 2005).

### 1.3 Asthmagenetik

#### 1.3.1 Familienanamnese, Zwillingsstudien und Segregationsanalysen – Handelt es sich bei Asthma um eine genetische Erkrankung?

Schon vor einiger Zeit wurde klinisch beobachtet, dass Asthma häufig mit einer positiven Familienanamnese verbunden ist, und dass es anscheinend ein vererbbares Risiko für die Entwicklung allergischer Erkrankungen gibt. Anhand von Zwillingsstudien, die eine wichtige Rolle bei der Untersuchung von genetischen Grundlagen pathologischer Merkmale spielen, konnte diese Vermutung bestätigt werden: im Fall von Asthma bronchiale konnte eine Erbllichkeit von bis zu 79 % festgestellt werden (FEIJEN et al. 2000). Zwillingsstudien sind besonders für die Abschätzung genetischer und umweltbedingter Einflüsse auf die Entwicklung einer komplexen Erkrankung wichtig. Der Vergleich zwischen monozygoten (Erbgut zu 100% identisch) und dizygoten Zwillingen, die in einer gemeinsamen Umwelt aufwachsen, zeigt, dass bei einem überwiegend genetisch bedingten Merkmal eineiige Zwillinge eine wesentlich höhere Konkordanz aufweisen als zweieiige. Ist dagegen die Diskonkordanz eines Merkmals bei den beiden Typen von Zwillingspaaren gleich, so spricht dies gegen eine genetische Beteiligung bei der beobachteten Varianz; die Merkmalsausprägung ist dann eher umweltbedingt. Im Fall von Asthma bronchiale, atopischer Dermatitis, Heuschnupfen und atopischen Phänotypen wie BHR, Gesamt-IgE und

spezifisches IgE konnte so eine signifikante genetische Beteiligung nachgewiesen werden (DUFFY et al. 1990; KOPPELMAN et al. 1999).

Bestätigt sich der Verdacht einer familiären Häufung, so wird versucht, mit Hilfe des statistischen Verfahrens der Segregationsanalyse den Vererbungsmodus der Erkrankung von Generation zu Generation zu ermitteln. Dabei werden die Verteilung und das Auftreten der Erkrankung über mehrere Generationen in einer möglichst großen Anzahl von Familien untersucht. Das beobachtete Verteilungsmuster wird mit den unter Annahme unterschiedlicher bereits bekannter Vererbungsmodelle errechneten Verteilungen verglichen. Liegt keine vererbare Erkrankung vor, so handelt es sich lediglich um ein zufälliges Auftreten von Symptomträgern innerhalb der Familie, dem kein bekannter Vererbungsmodus zuzuordnen ist. Multifaktorielle Erkrankungen wie Asthma bereiten hier besondere Probleme, da es sich um komplexe Erkrankungen handelt, die sowohl durch mehrere Gene als auch durch Umweltfaktoren beeinflusst werden können, und für die zunächst entsprechende Vererbungsmodelle berechnet werden müssen. So konnten für Asthma und Atopie, hier definiert über ein erhöhtes Gesamt-IgE im Serum, verschiedene genetische Modelle entwickelt werden, was unter anderem für eine polygenetische Erkrankung spricht (FEIJEN et al. 2000). Viele häufige Krankheiten folgen nicht den Mendelschen Regeln wie die monogenen Erkrankungen (TARIVERDIAN und BUSELMAIER 2004), sondern weisen einen polygenen Vererbungsmodus auf.

### 1.3.2 Methoden zur Identifikation asthmarelevanter Gene

Zur Identifikation jener Gene, die an der Entstehung von Asthma beteiligt sind, sind im wesentlichen zwei unterschiedliche Ansätze zu nennen: Kopplungsanalysen (Linkage studies), die zusammen mit Geschwisterpaaranalysen das Ziel haben, durch systematisches Screening des menschlichen Genoms asthmarelevante Gene zu entdecken, und der Ansatz der Kandidatengenanalyse (KABESCH 2001). Bei Kopplungsanalysen handelt es sich um ein Verfahren, bei dem unter Verwendung von genetischen Markern die Vererbung einzelner Genabschnitte von einer Generation zur nächsten innerhalb von Familien untersucht wird mit der Intention, bestimmte chromosomale Regionen (Loci) benennen zu können, die mit einem bestimmten Phänotyp kosegregieren. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Merkmal mit einem Markerallel kosegregiert, wird als LOD Score (log of the odds) ausgedrückt. Dieses wird als Verhältnis der Wahrscheinlichkeit einer Kopplung geteilt durch die Wahrscheinlichkeit einer Nichtkopplung dargestellt. Eine Kopplung wird als signifikant betrachtet, wenn der LOD-

Wert über +3 liegt. Ein LOD-Wert von -2 oder weniger spricht dafür, dass keine Kopplung vorliegt.

Im Rahmen der Geschwisterpaaranalyse werden Geschwister, die entweder beide erkrankt oder gesund sind, auf Unterschiede bei Mikrosatellitenmarkern (Tandem-Repeats) untersucht. Durch dieses Verfahren wird ermittelt, ob zwei Genorte bestehend aus einem potentiell Krankheitslocus und einem genetisch polymorphen Marker unabhängig voneinander segregieren. Diese Methode liefert weitere Hinweise auf Regionen, in denen sich krankheitsrelevante Gene befinden könnten. Da jedoch in diesen identifizierten Bereichen, die meist mehrere Megabasen (Mb) umfassen, häufig zahlreiche in Frage kommende Gene liegen, ist eine zusätzliche Einengung durch weitere Mikrosatellitenmarker notwendig. Um potentiell relevante Gene zu identifizieren, werden in einem darauffolgenden Schritt Assoziationsstudien oder im Fall von Kandidatengenen funktionelle Ansätze durchgeführt.

Genomweite Kopplungsstudien und Geschwisterpaaranalysen haben dazu beigetragen, krankheitsrelevante Gene für Asthma bronchiale und allergische Erkrankungen zu finden. Unterschiedliche Regionen des Genoms konnten dabei identifiziert werden, die eine Kopplung zwischen Markern und Phänotypen allergischer Erkrankungen aufweisen (KABESCH 2001).

Gene, die aufgrund ihrer bekannten Funktion, ihres Expressionsmusters oder ihrer Lage im Genom plausibel mit dem Krankheitsgeschehen in Verbindung gebracht werden können, nennt man Kandidatengene. Neben der Kopplungs- und Geschwisterpaaranalyse stellt die Untersuchung dieser Kandidatengene auf genetische Mutationen mit anschließendem Vergleich der Allelfrequenz in Fall- und Kontrollpopulation oder populationsbezogenen Assoziationsstudien eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung krankheitsrelevanter Gene dar. Meist handelt es sich bei den Mutationen um einen einzelnen Basenaustausch, auch SNP (single nucleotide polymorphism) genannt, welche im Genom ca. alle 1000 bp vorkommen. Tritt eine Mutation mit einer Häufigkeit >3% auf, spricht man von einem Polymorphismus. Andernfalls handelt es sich um eine seltene genetische Variante.

In oben bereits erwähnten Assoziationsstudien wird geprüft, ob ein bestimmtes Allel eines Kandidatengens in einer Probanden-Gruppe mit einem bestimmten Phänotyp signifikant häufiger vorkommt als in einer Kontrollpopulation. Der wesentliche Unterschied zwischen Kopplung und Assoziation liegt darin, dass die Kopplung eine Beziehung zu einem Locus und die Assoziation eine Beziehung zu einem bestimmten Allel darstellt. Eine positive Assoziation zwischen dem Polymorphismus und dem Phänotyp kann auf drei Arten interpretiert werden: entweder ist der Polymorphismus funktionell relevant und leistet einen

Beitrag zur Krankheitsursache, oder der Polymorphismus ist in einem Kopplungsungleichgewicht (Linkage Disequilibrium) mit einem anderen krankheitsauslösenden Polymorphismus, der sich an einem anderen Locus befindet, oder die Assoziation resultiert aus einem falsch-positiven Ergebnis auf Grund einer zufälligen Akkumulation des untersuchten Polymorphismus innerhalb der Studienpopulation (KABESCH 2004). Für diese auf Hypothesen basierende Methode ist ein tiefgründiges Verständnis der beteiligten Mechanismen im Rahme der Pathogenese der jeweiligen Krankheit essentiell, um eine erfolgreiche Auswahl von Kandidatengen zu treffen. Zum Beispiel sind sämtliche Faktoren der immunologischen Signalkaskade sowie pulmonale Strukturgene unter anderem interessante Kandidatengene, die zur Klärung der Ätiologie von Asthma und Atopie untersucht werden könnten.

### 1.3.3 Stand der Forschung in der Asthmagenetik

Wie bereits erwähnt, scheinen sowohl die allergische Entzündung als auch Strukturabnormalitäten der Lunge eine entscheidende Rolle in der Ätiologie des Asthma bronchiale zu spielen. Zahlreiche interessante und vielversprechende Polymorphismen in asthmarelevanten Genen wurden in publizierten Studien beschrieben.

#### 1.3.3.1 Gene der allergischen Inflammation

Auf dem langen Arm des Chromosoms 5 befinden sich die folgenden Kandidatengene für Asthma und Atopie: IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13. Diese Zytokine spielen als Entzündungsmediatoren in der TH-2-gewichteten Immunpathogenese des Asthma bronchiale eine entscheidende Rolle. Das konnte auch im Tiermodell gezeigt werden (HILTON et al. 1996; GRÜNIG et al. 1998; HOGAN et al. 1998; WILLS-KARP et al. 1998). Sowohl IL-4 als auch IL-13 regulieren die IgE-Produktion in B-Zellen. Dabei wirken sie über den IL-4- bzw. IL-13-Rezeptor, wobei diese aus mehreren transmembranen Rezeptorketten bestehen. Da beiden Rezeptoren die IL-4Ra-Kette (IL4Ra) gemein ist, kann IL-4 an beide Rezeptortypen binden. Der IL-13-Rezeptor besteht aus IL4Ra und zwei weiteren IL-13-bindenden Proteinen, genannt IL-13Ra1 und IL-13Ra2 (HILTON et al. 1996), die sich in ihrer Bindungsaffinität zum IL-13 unterscheiden. Der IL-4-Rezeptor ist sowohl auf B- als auch auf T-Zellen zu finden, so dass IL-4 beide Zelltypen stimulieren kann. IL-13 aktiviert über Rezeptorbindung neben B-Zellen auch Monozyten/ Makrophagen, dendritische Zellen, Eosinophile, Basophile und Fibroblasten, nicht jedoch T-Zellen, da IL-13Ra1 nicht auf deren Oberfläche exprimiert wird (GRABER et al. 1998). Durch Bindung von IL-4 und IL-13 an den jeweiligen Rezeptor

wird eine intrazelluläre Signalkaskade aktiviert: mit den Rezeptorketten assoziierte sogenannte Januskinasen (JAK) phosphorylieren STAT6-Moleküle (signal transducer and activator of transcription 6), welche als Dimere in den Nucleus translozieren und durch Bindung an bestimmte Promotorsequenzen von Zielgenen (z.B. IgE) die Transkription dieser Gene beeinflussen (WILLS-KARP 2004). So kommt es in B-Lymphozyten zu einem „Isotypenswitch“ von IgM zu IgE und IgG4. In TH-2-Zellen induziert STAT6 die GATA3-Aktivierung und ermöglicht dadurch diesen Zellen, ihre spezifische TH-2-Funktion beizubehalten. IL-4 reguliert somit seine eigene Produktion (KELLY-WELCH et al. 2003).

In der Literatur sind mehrere Polymorphismen sowohl im IL-4- und IL-13-Gen als auch in den jeweiligen Rezeptorgenen beschrieben (HERSHEY et al. 1997; GRAVES et al. 2000; HEINZMANN et al. 2000; SHIRAKAWA et al. 2000; LUI et al. 2003). In einem vollständigen Screening des IL-4-Gens, welches auf Chromosom 5q31 lokalisiert ist, wurden neben den zwei seit längerem bekannten Promotorpolymorphismen C-589T und C-33T (ROSENWASSER et al. 1995; SUZUKI et al. 1999) noch 14 weitere Polymorphismen in nichtkodierenden Bereichen des Gens identifiziert (KABESCH et al. 2003b). Eine bereits beschriebene Assoziation zwischen den oben genannten Promotorpolymorphismen und erhöhtem IgE-Spiegel (ROSENWASSER et al. 1995) konnte bei Kindern mit positivem Hautpricktest bestätigt werden. Eine positive Assoziation mit erhöhtem Gesamt-IgE weist auch ein von ihnen neu identifizierter Polymorphismus (VE6523) auf, der sich im dritten Intron des IL-4-Gens befindet. Diese auch im bovinen IL-4-Gen anderen Spezies konservierte Sequenz enthält mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren und kann daher für die Genregulation entscheidend wichtig sein. Alle drei Polymorphismen zeigen ebenfalls eine Assoziation mit Asthma, die bei Patienten mit positivem Hauttest stärker ist als bei Patienten mit negativem Test. Eine signifikante Assoziation zwischen den insgesamt 16 Polymorphismen und atopischer Dermatitis, bronchialer Hyperreaktivität, Heuschnupfen oder positivem Hautpricktest konnte nicht nachgewiesen werden (KABESCH et al. 2003b). Basehore et al. untersuchten in ethnisch unterschiedlichen Populationen den Zusammenhang zwischen Variationen im IL4-Gen und erhöhtem IgE-Spiegel und Asthma. Auch sie konnten den Verdacht bestärken, dass IL4-Polymorphismen Einfluss auf die Höhe des IgE-Spiegels haben könnten, jedoch schreiben sie den Effekt eher einem SNP in Intron 2 (3017 G/T) zu (BASEHORE et al. 2004). Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Rosenwasser und Kabesch zeigten Studien in England und Australien keinen Zusammenhang zwischen dem C-589T Polymorphismus und einem atopischen Phänotyp (WALLEY und COOKSON 1996). In einer japanischen Arbeit konnte eine Assoziation zwischen dem Polymorphismus C-33T und

atopischer Dermatitis sowie Asthma gefunden werden (KAWAKAMI et al. 1998; NOGUCCHI et al. 1998).

Im IL-4Ra Gen, welches auf Chromosom 16q12 lokalisiert ist, wurden bereits zahlreiche Polymorphismen entdeckt. 14 von ihnen wurden in kodierenden Bereichen des Gens beschrieben, wobei 10 davon zu einem Aminosäureaustausch führen (WU et al. 2001). Die Rezeptorvariante A1652G, die den Aminosäureaustausch Gln551Arg bewirkt, konnte gehäuft bei Patienten mit Hyper-Ig-E-Syndrom und schwerem atopischen Ekzem beobachtet werden (HERSHEY et al. 1997). Diese Ergebnisse wurden in anderen Studien jedoch nicht bestätigt (GLIMBACHER 1998; KRUSE et al. 1999; WOITSCH et al. 2004). Hershey et al. wiesen zusätzlich eine gesteigerte Phosphorylierung von STAT6 bei Vorliegen von Gln551Arg nach (HERSHEY et al. 1997) und versuchten damit die beobachtete IgE-Synthese zu erklären. In engem Kopplungsgleichgewicht zu Gln551Arg steht Ser478Pro, ein weiterer Rezeptorpolymorphismus (T1432C) in der intrazellulären Domäne der  $\alpha$ -Kette. Kruse et al. (KRUSE et al. 2002) zeigten ebenfalls einen Effekt von Gln551Arg auf die Phosphorylierung von STAT3 und vermuteten wie Hershey et al. Auswirkungen auf die Signaltransduktion. Die Effekte des Polymorphismus auf Komponenten der Signaltransduktion werden jedoch kontrovers diskutiert (WANG et al. 1999). Der Polymorphismus in der extrazellulären Domäne der Rezeptorkette A148G führt zu einem Aminosäureaustausch an der Stelle 50 (Ile50Val). In in vitro-Studien konnte eine erhöhte IgE-Produktion bei der Expression des A (Ile)-Allels nachgewiesen werden (MITSUYASU et al. 1999). Woitsch et al. (WOITSCH et al. 2004) untersuchten drei der genannten Polymorphismen (A148G, T1432C und A1652G) in einer groß angelegten Assoziationsstudie mit deutschen Probanden (N=1120). Lediglich T1432C zeigte hier den Trend eines protektiven Effektes für die Entwicklung einer atopischen Rhinitis. Des Weiteren konnte ein nur grenzwertig signifikanter Trend für A148G bezüglich erhöhtem Serum-IgE beobachtet werden. Auch die durchgeführten Haplotyp-Analysen wiesen nur eine schwache Assoziation zwischen der Regulation der IgE-Spiegel und den IL4Ra-Haplotypen auf. Eine Assoziation zu Asthma konnte nicht gezeigt werden.

Nur 25 kb entfernt vom IL-4-Gen befindet sich das Gen für IL-13. Obwohl das IL-13-Protein nur zu 25% homolog ist zum IL-4, weist es doch einige strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten mit IL-4 auf. Dies erklärt auch die Tatsache, dass sich beide Zytokine eine Rezeptorkette in ihrem individuellen Rezeptorkomplex teilen (ZURAWSKI et al. 1993). Wie IL-4 ist auch IL-13 ein Schlüsselement in der allergischen Immunreaktion. Es wird heute angenommen, dass IL-4 vor allem für die Initiierung der TH-2-polarisierten Antwort bei Allergenkontakt verantwortlich ist, während IL-13 wohl allein die typischen, physiologischen



Erscheinungsbilder des Asthma bronchiale wie BHR, Mukushypersekretion und subepitheliale Fibrose hervorrufen kann (WILLS-KARP 2004). Zahlreiche Arbeitsgruppen haben bereits Assoziationen zwischen Polymorphismen im IL-13-Gen und atopischem Phänotyp zeigen können (VAN DER POW KRAAN et al. 1999; GRAVES et al. 2000; HEINZMANN et al. 2000). So wurden die beiden Promotorpolymorphismen A1512C und C-1112T identifiziert, deren Assoziation mit Gesamt-IgE in mehreren Populationen beobachtet werden konnte (GRAVES et al. 2000). van der Pouw Kraan et al. zeigten, dass die C- nach T-Substitution an der Stelle -1112 mit einer veränderten IL-13-Produktion in stimulierten T-Zellen assoziiert ist (VAN DER POW KRAAN et al. 1999), was vermutlich auf eine Einflussnahme des Polymorphismus auf das Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren im Promotorbereich zurückzuführen ist. Fünf weitere Polymorphismen sind im IL-13-Gen bekannt, die in absolutem Kopplungsgleichgewicht miteinander stehen: C1923T in Intron 3, G252A, C2580A und C2749T in der 3'-UTR sowie G2044A in der kodierenden Region des Gens (Exon 4), der zum Aminosäureaustausch Arg110Gln in jenem Bereich von IL-13 führt, der entscheidend an der Rezeptorbindung beteiligt ist (GRAVES et al. 2000; HEINZMANN et al. 2000). Arima et al. zeigten in ihren Untersuchungen erhöhte IL-13-Spiegel bei der Expression der Gln110-Variante (ARIMA et al. 2002).

Im Gegensatz zum IL-4-Rezeptor sind die beiden IL-13-spezifischen Rezeptorkomponenten IL-13Ra1 und IL-13Ra2, deren Gene sich auf dem langen Arm des X-Chromosoms befinden (Xq13), weniger ausführlich untersucht. Drei Polymorphismen sind im kodierenden Bereich des IL-13Ra1-Gens beschrieben worden, wobei es sich bei allen um stumme Mutationen handelt, die somit zu keiner Aminosäureänderung führen. Neben zwei extrem seltenen Varianten, konnte für einen Polymorphismus in der 3'-UTR (A1398G) in einer britischen Studie eine Assoziation mit erhöhten Gesamt-IgE-Werten, jedoch nicht mit Asthma gefunden werden (HEINZMANN et al. 2000).

### **1.3.3.2 Strukturgene**

Obwohl die Th-2-gewichtete Entzündungsreaktion und die Aktivierung der immunologischen Kaskade zweifellos eine zentrale Rolle in der Ätiologie von Asthma bronchiale spielen, erklärt dies alleine nicht die organspezifische Ausprägung der Erkrankung. Atopie ist zwar einer der stärksten Risikofaktoren, der mit Asthma assoziiert ist, jedoch erklären weder eine atopische Prädisposition noch die Eosinophilie, warum zum Beispiel der eine Patient an Asthma erkrankt und der andere an Neurodermitis. Genetische Studien demonstrieren

außerdem unterschiedliche Vererbungsmodi für Atopie und bronchiale Hyperreaktivität (BHR), einem der fundamentalen Merkmale dieser chronischen Lungenerkrankung (SKADHUAGE et al. 1999). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass lokale Faktoren in der Lunge eine Bedeutung aufweisen, weshalb einzelne Individuen für die Entwicklung von Asthma prädisponiert sind und nicht an einer anderen Form von Atopie erkranken (HOLGATE 1999). Während lange angenommen wurde, dass das sogenannte pulmonale Remodeling eine Folge der chronischen Entzündung sei, konnten Pohunek et al. anhand von Biopsien zeigen, dass strukturelle Veränderungen in der Lunge bis zu vier Jahren vor dem Auftreten von klinischen Symptomen nachgewiesen werden können (POHUNEK et al. 2000). Dies deutet auf einen Prozess hin, der wohl sehr früh in der Krankheitsentwicklung einsetzt und eventuell parallel zum chronischen Entzündungsgeschehen verläuft oder vielleicht diesen erst ermöglicht.

Bei der Suche nach dem genetischen Ursprung von BHR und Remodeling konnte durch Positional Cloning ADAM33 als ein neues, vielversprechendes „Asthmagene“ identifiziert werden, welches auf Chromosom 20p13 lokalisiert ist (VAN EERDEWEGH et al. 2002). Die von van Eerdewegh et al. durchgeführten Kopplungsanalysen mit ADAM33 zeigen, dass Asthma in Kombination mit BHR eine stärkere statistische Signifikanz aufweisen als Asthma in Kombination mit Gesamtserum-IgE oder allergenspezifisches IgE. Dieses Phänomen deutet darauf hin, dass das ADAM33-Gen eher mit der veränderten Lungenfunktion als mit dem Entzündungsgeschehen an sich im Zusammenhang steht (HOLGATE et al. 2003).

ADAM33 gehört zu der ADAM- (a disintegrin and metalloprotease) Genfamilie der zinkabhängigen membranständigen Metalloproteasen. Mitglieder dieser Familie weisen eine komplexe Organisation mit unterschiedlichen Domänen auf. ADAM33 kann zu der ADAM 12, 15 und 19 -Unterfamilie mit proteolytischer Aktivität gerechnet werden (PRIMAKOFF und MYLES 2000) (BLACK und JM 1998). Es wird vornehmlich in glatten Muskelzellen, Myofibroblasten und Fibroblasten exprimiert, nicht aber in Epithelzellen, T-Zellen oder Leukozyten (VAN EERDEWEGH et al. 2002). Die selektive Expression von ADAM33 in mesenchymalen Zellen lässt vermuten, dass Veränderungen in seiner Aktivität im Zusammenhang stehen mit abnormen Funktionen der glatten Bronchialmuskulatur, so wie es bei BHR im Rahmen von Asthma beobachtet werden kann (DAVIES et al. 2003). Obwohl die Funktionen von ADAM33 bis jetzt nicht genau geklärt sind, wird auf Grund der beschriebenen Funktionen anderer ADAM-Proteine ADAM33 eine Vielzahl von Aufgaben im Ablauf mesenchymaler Zellfunktionen zugeschrieben (z.B. Protein-gebundene Zellfusion und Zelladhäsion, Signaltransduktion, Proteolyse). Die Dysregulation einer oder mehrerer

dieser Funktionen könnte die Entwicklung von BHR erklären. In Studien konnten unterschiedliche Splicingprodukte von ADAM33 nachgewiesen werden, so dass der Vorgang des alternativen Splicings eventuell eine Vorbedingung für die Ausführung verschiedener Zellfunktionen ist (DAVIES et al. 2003).

Ein Vielzahl von SNPs konnten bereits im ADAM33-Gen identifiziert werden. Van Eerdewegh et al. entdeckten in einer US- und UK-Population 15 SNPs, die signifikant mit Asthma und/ oder BHR assoziiert waren (VAN EERDEWEGH et al. 2002). Die durchgeführten Haplotypanalysen zeigten eine noch stärkere Signifikanz, ebenfalls für Asthma und/ oder BHR. Die 3'-Region von ADAM33, in der die transmembranen und cytoplasmatischen Domänen des Proteins kodiert werden, scheint eine Schlüsselregion für die Assoziation mit Asthma und BHR zu sein. Studien an weiteren Populationen konnte die von van Eerdewegh et al entdeckten Assoziationen zwischen SNPs in ADAM33 und Asthma und/ oder BHR nur bedingt bestätigen (WERNER et al. 2004) (LEE et al. 2004). Im Gegensatz dazu konnten andere Arbeitsgruppen keinen Zusammenhang zwischen Asthma und SNPs in ADAM33 zeigen (RABY et al. 2004; BLAKEY et al. 2005). Raby et al. gehen auf Grund ihrer durchgeführten Assoziationsstudie mit einer nordamerikanischen Population vielmehr von der Möglichkeit aus, dass sich der asthmarelevante Locus in der nahen genomischen Region von ADAM33 befindet, jedoch nicht in ADAM33 selbst liegt (RABY et al. 2004). Variationen in ADAM33 wurden auch auf ihre Auswirkungen auf den Verlauf und das Fortschreiten der Erkrankung bei bereits diagnostiziertem Asthma bronchiale untersucht. In einer derartigen Studie konnte eine signifikante Assoziation zwischen einem in der 3'-Region gelegenen SNP und einer massiven jährlichen Abnahme der Lungenfunktion gezeigt werden (JONGEPIER et al. 2004). Da eine Vielzahl der im ADAM33-Gen identifizierten SNPs in Intronbereichen des Gens liegen und auf Grund der Kenntnis von mehreren Splicing-Varianten des ADAM-Proteins, vermuteten Powell et al, dass diese SNPs möglicherweise Auswirkungen auf den Splicingvorgang haben und damit ihre funktionelle Relevanz erklärt werden kann (POWELL et al. 2004).

Neben ADAM33 ist an dieser Stelle das humane CC16-Gen (Clara Cell Secretory gene) als weiteres Strukturgen zu nennen, welches für ein 16 kDa Protein kodiert und auf Grund seiner primären Expression in der Lunge, seiner anti-inflammatorischen Funktion und seiner Lokalisation auf Chromosom 11q12-13 ebenfalls als hochinteressantes Kandidatengen betrachtet werden kann, das an der Barrierefunktion der Lunge beteiligt ist. Das CC16-Protein macht den größten Anteil an den durch das respiratorische Epithel sezernierten Proteinen aus (bis zu 5% des Gesamtproteins aus der bronchoalveolären Lavage (BAL)) (BERNARD et al.

1992). Es ist vor allem ein Produkt der Clara-Zellen in Bronchien und nasalem Epithel. Diese Zellen spielen möglicher Weise eine wichtige immunmodulatorische und entzündungshemmende Rolle bei Inflammationen der Luftwege (BROECKAERT und BERNARD 2000). Der antiphlogistische Effekt von CC16 scheint auf einer Hemmung der pro-inflammatorischen Enzyme Phospholipase A2 (PLA2) und Transglutaminase zu beruhen. Beide besitzen eine Schlüsselposition im Arachidonsäurestoffwechsel während akuten allergischen Entzündungen, wodurch sie die Synthese von Prostaglandinen und Leukotrienen kontrollieren (LEVIN et al. 1986). CC16 inhibiert ebenfalls die Chemotaxis von Neutrophilen und Monozyten und reguliert Fibroblastenproliferation sowie deren Migration (LESUR et al. 1995). In Vitro zeigt CC16 das Potential, die Expression von Interferon  $\gamma$  sowie dessen biologische Aktivität zu unterdrücken (DIERYNCK et al. 1995). Es wird angenommen, dass CC16 eine protektive Rolle gegen pro-inflammatorische Einflüsse in der Lunge hat, so dass möglicherweise Individuen mit eingeschränkter CC16-Aktivität eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber entzündlichen Lungenerkrankungen wie Asthma bronchiale aufweisen. Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, dass Asthmapatienten einen signifikant niedrigeren CC16-Spiegel in BAL und Serum aufweisen als gesunde Kontrollen (SHIJUBO et al. 1999). Im Tiermodell konnte bei Mäusen mit CC16-Mangel eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress, eine gesteigerte Eosinophilen-Infiltration sowie eine vermehrte Expression von Th2-Zytokinen im Lungengewebe nachgewiesen werden (JOHNSTON et al. 1997; MANGO et al. 1998; CHEN et al. 2001). Des weiteren zeigte JOHANSSON et al. bei Kindern mit Birkenpollen induziertem Heuschnupfen ebenfalls einen erniedrigten CC16-Spiegel im Nasensekret (JOHANSSON et al. 2005). Er geht davon aus, dass ein Mangel an diesem entzündungshemmenden Protein die Entwicklung einer allergischen Rhinitis begünstigen kann. Der CC16-Spiegel kann scheinbar auch durch Glukokortikoide beeinflusst werden. So regulieren Glukokortikoide die Expression von CC16 sowohl während der Entwicklung als auch in der Adoleszenz (LOMARDEO und NIETO 1981; NORD et al. 1992). Eine in vitro Studie mit primären Clara-Zellen zeigte eine Hochregulation von CC16 nach Steroidstimulation (BERG et al. 2002). Diese beschriebene Wirkung von Steroiden auf den CC16-Spiegel konnte JOHANSSON et al bei den in seiner Studie untersuchten Kindern mit allergischer Rhinitis nicht beobachten: trotz 7-10 Tage langer Behandlung mit einem lokalen Steroid wurde kein Anstieg des CC16-Spiegels verzeichnet. Es liegt die Vermutung nahe, dass genetische Polymorphismen Ursache für eine verminderte CC16-Produktion sind, die auch unter Steroidstimulation nicht gesteigert werden kann (JOHANSSON et al. 2005). LAING et al identifizierte einen SNP in der nichtkodierenden Region von Exon1 des CC16-

Gens (A38G) und beschrieb eine Assoziation des AA-Genotyps mit Asthma, erhöhter BHR und erniedrigtem CC16-Serumspiegel in einer australischen Population (LAING et al. 1998a; LAING et al. 1998b; LAING et al. 2000). Gen-Expressions-Studien zeigten, dass das A-Allel eine 25%ig geringere Expressionsrate aufweist als das G-Allel, was für einen möglichen Aktivitätsverlust von CC16 bei Trägern des A-Allels spricht (KIM et al. 2001). In einer Studie mit deutschen Kindern wurde zwar beobachtet, dass Asthmatiker mit dem 38AA-Genotyp einer erhöhte BHR zeigten als Asthmatiker mit dem 38GG-Genotyp, jedoch konnte keine Assoziation zwischen Asthma-Inzidenz und dem A38G-Polymorphismus nachgewiesen werden (SEGLER et al. 2003). Auch Untersuchungen an Populationen mit japanischen und britischen Erwachsenen (GAO et al. 1998; MANSUR et al. 2002) sowie nordamerikanischen Kindern (BALDINI et al. 1998) konnten die von LAING et al beschriebenen Assoziationen nicht bestätigen. CANDELARIA et al veröffentlichten die erste Assoziation zwischen Asthma und A38G-Polymorphismus im Erwachsenenalter. Da jedoch keine Assoziation mit Atopie nachgewiesen werden konnte, gibt es hier scheinbar einen pathophysiologische Mechanismus, der ohne oder parallel zum Th1/ Th2-Prozeß abläuft (CANDELARIA et al. 2005). Des Weiteren zeigte das A-Allel in dieser Untersuchung einen positiven Trend bezüglich atopischer Dermatitis. Für die Klärung dieser Beobachtung sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass die Untersuchung von lungenspezifischen Strukturgenen immer mehr in den Interessensmittelpunkt der Asthmagenetik rückt. Neben der seit langem etablierten Theorie der Th2-gewichteten Entzündungsreaktion und der immunologischen Kaskade im Rahmen der Ätiologie des Asthma bronchiale deutet immer mehr auf die Mitbeteiligung pulmonaler Strukturen hin. Die hier vorgestellten Strukturgene ADAM33 und CC16 sind nur eine kleine Auswahl an interessanten Strukturgenen. Des weiteren sind an dieser Stelle die Strukturgene GPRA und ADRB2 zu nennen (REIHS AUS et al. 1993; MARTINEZ et al. 1997; SUMMERHILL et al. 2000; KORMANN et al. 2005). Auch von anderen Erkrankungen, wie der zystischen Fibrose, ist bereits bekannt, dass ein genetischer Defekt in einer pulmonalen Struktur zu einer schwerwiegenden Erkrankung der Atemwege führen kann (RIORDAN et al. 1989); (LEMNA et al. 1990); (KEREM et al. 1989).

### 1.4 Auswahl von CLNS1A im Rahmen der Asthmagenetikforschung

Das humane Gen CLNS1A stellt hinsichtlich seiner Lokalisation auf Chromosom 11 und seiner Eigenschaften (siehe unter 1.5) ein interessantes Untersuchungsobjekt im Rahmen der Asthmagenetikforschung dar. Mehrere Kopplungsanalysen weisen auf eine Beteiligung von Genen auf dem langen Arm von Chromosom 11 an der Entstehung atopischer Erkrankungen hin. Des Weiteren scheint das CLNS1A-Gen auf Grund seiner Funktionen in der Zelle interessant zu sein. So spielt CLNS1A eine wichtige Rolle in der Volumenregulation. Die Fähigkeit, das Zellvolumen konstant zu halten und auf ständige osmotische Veränderungen in ihrer Umgebung reagieren zu können, ist essentiell für das Überleben der Zelle. Zellen müssen aber auch ihr Volumen verändern können, um spezifischen Funktionen wie Sekretion, Migration oder Zellteilung auszuführen. Störungen dieser Vorgänge würden zu schwerwiegenden Dysfunktionen führen. Es ist vorstellbar, dass Mutationen im CLNS1A-Gen die regulierte Volumenabnahme nach Zellschwellung (RVD) beeinflussen, was zu einer Schleimhautschwellung in der Lunge beiträgt, wie es bei Asthma bronchiale beobachtet wird. Darüber hinaus könnten aber auch Mukusproduktion und Kontraktilität der Bronchialmuskulatur beeinflusst werden.

Veränderungen in der Chloridpermeabilität von Zellen stellen die Basis einer Vielzahl vererbbarer Erkrankungen beim Menschen dar: die Myotonia congenita Thomsen, die Dent's Erkrankung und das Bartter's Syndrom (WALEGGER und JENTSCH 2000). Ebenfalls zu nennen ist die Zystische Fibrose (Mukoviszidose), eine autosomal-rezessive Stoffwechselstörung mit genetischem Defekt auf Chromosom 7, welcher eine generalisierte Dysfunktion exokriner Drüsen bedingt. Die Erkrankung zeichnet sich durch die vermehrte Produktion eines hochviskösen Sekretes in Bronchien und Verdauungstrakt und den damit verbundenen Komplikationen aus. Defekte im CLNS1A-Gen könnten ebenfalls den Chloridstrom in Zellen beeinträchtigen und die Mukusproduktion verändern, so wie es bei Patienten mit Asthma bronchiale beobachtet wird. Auf Grund des hochviskösen Schleims in den Bronchien sind Obstruktion der Atemwege, Überblähung mit „Air trapping“ und Störungen der Ventilation-Perfusion charakteristische Störungen der Lungenfunktion bei Patienten mit Zystischer Fibrose, die an das obstruktive Lungenfunktionsbild des Asthma-Patienten erinnern. Ein veränderter Chloridstrom durch Mutationen im CLNS1A-Gen könnte somit die Störung der Lungenfunktion bei Asthma bronchiale beeinflussen, ähnlich wie es bei Zystischer Fibrose beobachtet werden kann.

Des Weiteren scheint CLNS1A bzw. das durch dieses Gen kodierte Protein  $I_{Cl_{in}}$  essentiell für das Überleben von Organismen zu sein, da bis jetzt alle Knockout-Versuche an der Letalität

der Versuchsorganismen gescheitert sind (PU et al. 2000). Veränderungen in diesem überlebenswichtigen Gen könnten Auswirkungen auf die Lungenstruktur haben, so dass möglicherweise eine erhöhte Empfindlichkeit für chronische Lungenerkrankungen gegeben ist.

Es ist ebenfalls bekannt, dass  $I_{Cln}$  über Interaktionen mit anderen zytosolischen Proteinen Einfluss auf den Splicing-Vorgang nimmt. Auch über diesen Weg könnten Mutationen im CLNS1A-Gen indirekt in die Pathogenese von Asthma und Atopie verwickelt sein.

### 1.5 CLNS1A – ein mögliches Kandidatengen?

Das CLNS1A-Gen kodiert für einen Chloridkanal, der ab der Entwicklungsstufe der Säugetiere ubiquitär exprimiert wird. Dieses humane Gen, welches auf dem langen Arm von Chromosom 11 (11q13.5-q14.1) lokalisiert ist, enthält sieben Exons, die durch insgesamt sechs Introns von einander getrennt werden. Mit ca. 96% umfasst der Intronbereich den größten Anteil des Gens (NAGL et al. 1996). Der Promotor, dem eine TATA-Box fehlt, ist für eine erstaunlich hohe Expression von CLNS1A verantwortlich. Seine Effizienz ist mit viralen RSV- oder CMV-Promotoren vergleichbar. Neben einer minimalen Promotorlänge von 89 Nucleotiden zwischen den Positionen -163 und -74 konnten mehrere Initiatorregionen für die CLNS1A-Expression nachgewiesen werden (SCANDELLA et al. 2000). Das von CLNS1A kodierte Protein besteht aus 237 Aminosäuren, welches den Chlorid-Kanal  $I_{Cln}$  formt, der im Jahre 1992 von Paulmichl et al. mittels Expressionsklonierung identifiziert werden konnte (PAULMICHL et al. 1992). Dieser neu entdeckte Chloridkanal ähnelt in seiner Kinetik, Pharmakologie und Selektivität bereits bekannten Chloridkanälen, die in einer Vielzahl von Zellen nach Zellschwellung aktiviert werden. Veränderungen des Zellvolumens können nach plötzlichem Absinken der extrazellulären oder Ansteigen der intrazellulären Osmolarität auftreten. Die Zelle versucht dieser Volumenzunahme durch Aktivierung von Chlorid- und Natriumkanälen entgegenzuwirken, was zu einem Nettoauswärtsstrom von Salz führt, dem Wasser folgt. Dieser Prozess wird als regulierte Volumenabnahme (RVD) bezeichnet (LANG et al. 1998). Dass es sich bei  $I_{Cln}$  um einen der hauptverantwortlichen Chloridkanäle im Rahmen der regulierten Volumenabnahme handelt, konnte in mehreren Untersuchungen gezeigt werden: das spezifische Ausschalten von  $I_{Cln}$ -Protein unter Einsatz von  $I_{Cln}$  spezifischen Antikörpern (KRAPIVINSKY et al. 1994) oder Antisense-Oligonukleotiden (GSCHWENTNER et al. 1995a) führte zu einer Suppression des ansonsten nach Zellschwellung beobachteten Chloridstroms. Im Gegensatz dazu kommt es bei einer Überexpression von  $I_{Cln}$  zu einer gesteigerten Aktivität von schwellungsabhängigen

Chloridkanälen und einem verstärkten Chloridauswärtsstrom nach hypotonem Stress (HUBERT et al. 2000). Der Mechanismus der Kanalaktivierung nach Zellschwellung ist im Einzelnen nicht bekannt. Anscheinend spielt intrazelluläres ATP bei diesen Vorgängen eine wichtige Rolle (HILGEMANN 1997). Bond et al. vermuten für  $I_{Cln}$  einen ATP-abhängigen und –unabhängigen Mechanismus der Aktivierung (BOND et al. 1999).

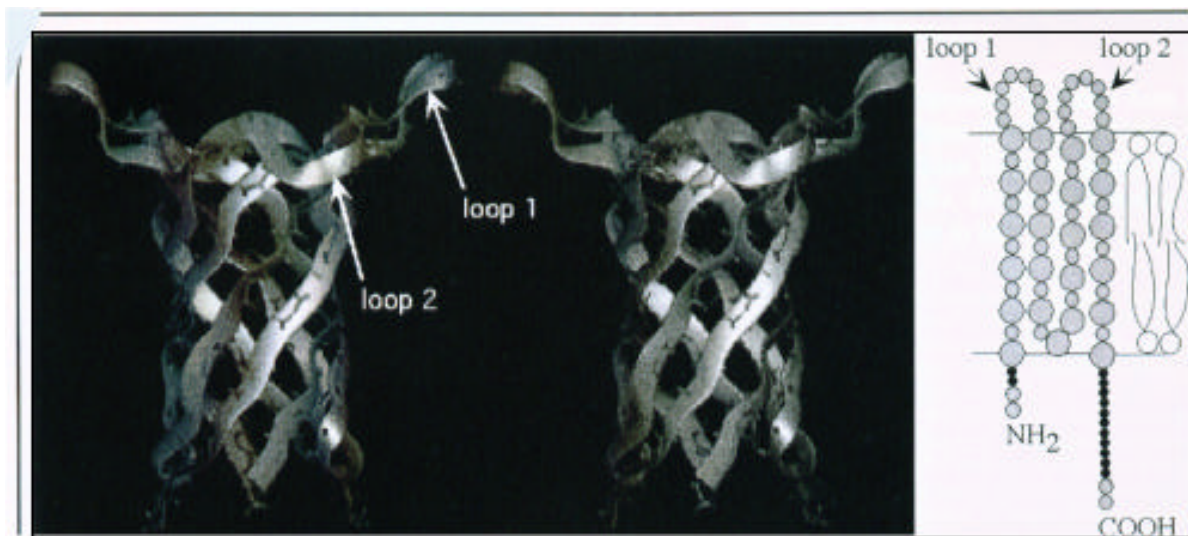
Ob es sich bei  $I_{Cln}$  tatsächlich um das kanalbildendes Protein handelt oder doch nur um einen Regulator im Rahmen der regulierten Volumenabnahme wird kontrovers diskutiert (HUBERT et al. 2000). Dennoch weisen unter anderem funktionelle Rekonstruktionen von  $I_{Cln}$  in Lipiddoppelschichten eher darauf hin, dass es sich bei dem Protein  $I_{Cln}$  um den Kanal an sich handelt (FÜRST et al. 2000a). Interessanterweise scheint die Qualität der Lipiddoppelschicht (künstlich oder natürlich) einen Einfluss auf die Selektivität des Kanals zu haben (GARAVAGLIA et al. 2002). Untersuchungen mit Fibroblasten ergaben, dass  $I_{Cln}$  sowohl in gelöster Form im Zytoplasma der Zelle als auch in membranassoziierter Form vorliegt. Eine Zunahme des Zellvolumens führte hier zu einer reversiblen Umverteilung von  $I_{Cln}$  zugunsten der membranassozierten Form (RITTER et al. 2003). Ähnliche Resultate wurden ebenfalls von Experimenten mit kardialen Myozyten aus Ratten berichtet (MUSCH et al. 1997; MUSCH et al. 1998). Dennoch werden diese Beobachtungen kontrovers diskutiert, denn Versuche mit C<sub>6</sub> Gliomzellen der Ratte konnten zum Teil dies nicht bestätigen (EMMA et al. 1998a).

$I_{Cln}$  kann durch verschiedene extrazellulär applizierte Chloridkanalblocker, wie NPPB (5-Nitro-2-(3-Phenylpropylamino)-benzolsäure), DIDS (4,4'-Diiodthiocyanatostilbene-2,2'-Disulfonsäure) und Phenolderivate geblockt werden (PAULMICHL et al. 1992; GSCHWENTNER et al. 1996a). Eine besondere Eigenschaft von  $I_{Cln}$  ist seine Sensitivität für extrazelluläre Nukleotide inklusiv cAMP, ATP, cGMP und ITP. Neben Nukleotiden können auch Nukleoside wie AZT oder Acyclovir  $I_{Cln}$  und somit den Vorgang der regulierten Volumenabnahme blockieren (PAULMICHL et al. 1992; GSCHWENTNER et al. 1995b). Auch Nedocromil, ein Mastzellstabilisator, der in der Therapie des Asthma bronchiale eingesetzt wird, scheint die Funktion des Kanals zu behindern (PAULMICHL et al. 1995). Des Weiteren zeigt  $I_{Cln}$  eine spannungsabhängige Inaktivierung für Potentiale über 40mV (PAULMICHL et al. 1992).  $I_{Cln}$  ist nicht nur für Chlorid permeabel, sondern auch für andere Anionen ( $I > Br^- > Cl^- > F^-$ , Eisenman- Anionenpermeabilität Typ I) und Kationen, abhängig von pH, intrazellulärer Kalziumkonzentration und Zusammensetzung der Lipiddoppelschicht (FÜRST et al. 2002; GARAVAGLIA et al. 2002).



Zahlreiche Untersuchungen wurden unternommen, um die Sekundär- bzw. Tertiärstruktur des  $I_{Cln}$ -Proteins zu identifizieren. Analysen der Aminosäuresequenz und Hydrophobizitätsanalysen gaben Hinweise auf eine Transmembrandomäne am N-terminalen Ende von  $I_{Cln}$  bestehend aus vier  $\beta$ -Faltblattstrukturen, welche den porenformenden Teil des Kanals bilden. Es bestehen bemerkenswerte Sequenzhomologien dieser vorhergesagten  $\beta$ -Faltblätter von  $I_{Cln}$  mit den porenformenden  $\beta$ -Hairpin-Strukturen der bakteriellen Toxine Alphahämolysin und Leukozidin (PAULMICHL et al. 1992; FÜRST et al. 2000b). Damit das  $I_{Cln}$ -Protein einen funktionsfähigen Kanal bilden kann, wird die Formation zu einem Homodimer gefordert. Mit Hilfe von Mutationsexperimenten konnte das Vorhandensein einer bereits vermuteten Nukleotid-Bindestelle, welche die Nukleotid-Sensitivität von  $I_{Cln}$  erklärt, im Eingangsbereich des Kanals nachgewiesen werden (PAULMICHL et al. 1992). Des Weiteren wurde so eine Bindestelle für Kalzium entdeckt, die Einfluss auf die Selektivität von  $I_{Cln}$  ausübt. Das zurzeit gängige Kanalmodell für  $I_{Cln}$  kann Abb.8 entnommen werden.

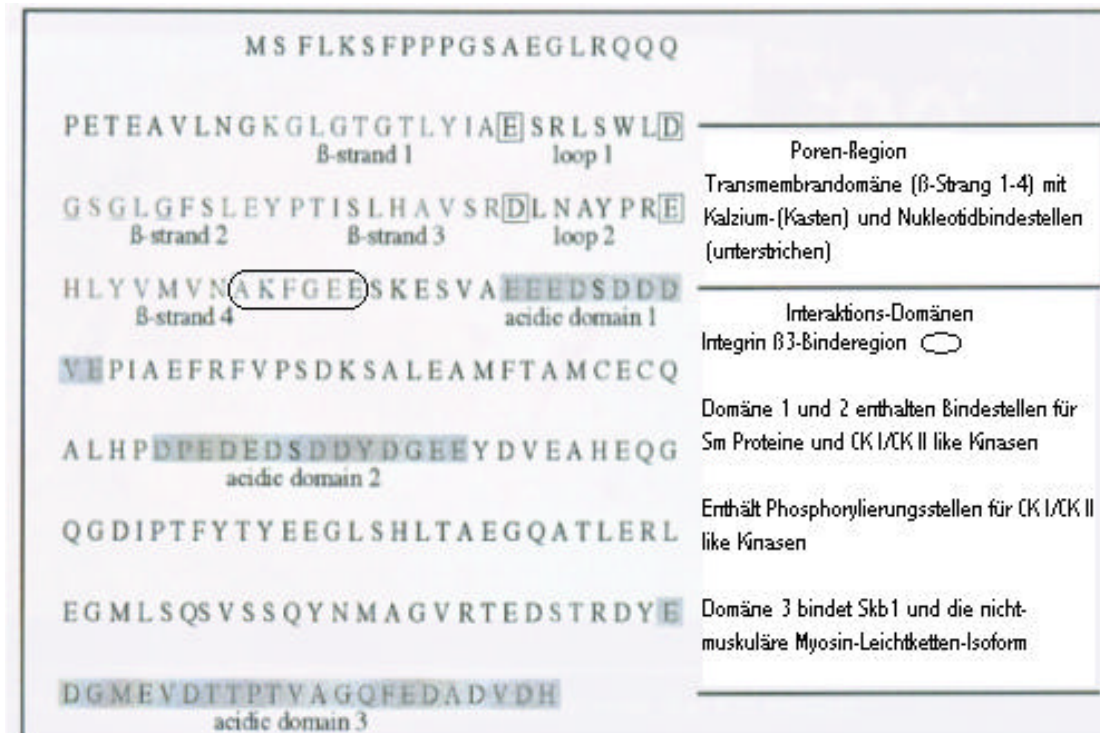
**Abbildung 8: Struktur des möglichen Modells eines  $I_{Cln}$  Homo Dimers (links) und schematisches Modell eines  $I_{Cln}$  Monomers (rechts) nach FÜRST et al.**



$I_{Cln}$  geht Interaktionen mit einer Vielzahl unterschiedlicher zytosolischer Proteine ein. Wechselwirkungen mit Proteinen des Zytoskeletts wie Aktin (KRAPIVINSKY et al. 1994; SCHWARTZ et al. 1997), Erythrozytenprotein 4.1 (TANG und TANG 1998), einem humanem Homolog von yeast SKb1 (KRAPIVINSKY et al. 1998), einer nicht-muskulären Isoform der Myosin-Leichtkette (EMMA et al. 1998b) und dem Thrombozyten-spezifischen Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (LARKIN et al. 2004) konnten demonstriert werden. Außerdem assoziiert  $I_{Cln}$  mit Casein/II like Kinase (SANCHEZ-OLEA et al. 1998) und den Sm-Proteinen B/B', D1 und D3 und hat somit Einfluss auf den Splicing-Vorgang (PU et al. 1999). Die

entscheidenden Interaktionsdomänen für diese Proteinwechselwirkungen sind zum Teil bereits in der Sequenz von  $I_{Cln}$  bekannt (Abb.9). Aus all diesen Erkenntnissen lässt sich folgern, dass  $I_{Cln}$  anscheinend multiple Funktionen innerhalb der Zelle ausübt. Mit dem Konzept der Multifunktionalität könnte auch der letale Effekt von  $I_{Cln}$ -Knockouts erklärt werden (PU et al. 2000).

**Abbildung 9: Aminosäuresequenz von  $I_{Cln}$  und deren funktionelle Domänen (nach FÜRST et al./ LARKIN et al.)**



Bei der Suche nach der chromosomalen Lokalisation von  $I_{Cln}$  im Jahre 1996 konnte ein zweiter Genlocus (CLNS1B) auf Chromosom 6 an Position 6p12.1-6q13 identifiziert werden (NAGL et al. 1996), wobei es sich um eine intronlose Kopie von CLNS1A (91,3%ige Homologie zur kodierenden Region von CLNS1A) handelt. Da CLNS1B diejenigen Sequenzregionen fehlen, die in CLNS1A für die transmembranen Bereiche von  $I_{Cln}$  kodieren, liegt der Verdacht nahe, dass es sich bei CLNS1B lediglich um ein Pseudogen handelt, das keine funktionelle Relevanz aufweist (NAGL et al. 1997).

### **1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit sollten im Rahmen eines Mutationsscreenings mittels direkter Sequenzierung sämtliche Polymorphismen in der proteinkodierenden Region von CLNS1A einschließlich flankierender Intronbereiche (je 500 bp) und in der 5'-bzw. 3'-UTR (2000 bzw. 1000 bp) identifiziert werden. Eine anschließende Assoziationsstudie mit einer Fall-Kontroll- bzw. einer Querschnittspopulation deutscher Schulkinder (9-11 Jahre) der ISAAC II Studie wurde durchgeführt, um den Effekte zwischen der im CLNS1A-Gen vorhandenen Polymorphismen und atopischen Phänotypen (Asthma, Heuschnupfen, atopischer Dermatitis und bronchialer Hyperreaktivität) sowie einer Beeinträchtigung der Lungenfunktion zu untersuchen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

Die im Weiteren aufgeführten Methoden sind öffentlich im Internet unter [www.asthmagene.de](http://www.asthmagene.de) zugänglich (LENZ et al. 2006).

### 2.1 Die Populationen

#### 2.1.1 Die Mutations-Screening-Population

Für das Mutations-Screening wurde eine Zufallsstichprobe von Atopikern und Nicht-Atopikern verwendet, bestehen aus 37 freiwilligen, erwachsenen Probanden aus der deutschen Allgemeinbevölkerung, die für vorhergehende Studien bereits rekrutiert wurde.

Jedem Probanden wurde Blut abgenommen und die DNA mit einer Standard-Aussalzmethode nach Miller (MILLER et al. 1988) isoliert. Die DNA-Konzentration und –Reinheit wurde anschließend photometrisch bestimmt. Die genomische DNA dieser Population wurde in der vorliegenden Arbeit für alle Sequenzierreaktionen im Rahmen des Mutations-Screenings im CLNS1A-Gen benutzt.

#### 2.1.2 Die Studienpopulation für Assoziationsstudien

Im Rahmen der International Study of Asthma and Allergies in Childhood Phase II (ISAAC II), einer internationalen Vergleichsstudie zur Erforschung von Asthma und Allergie, wurden in den Jahren 1995/96 in den deutschen Städten München und Dresden Kinder der 4. Schulklasse (Altersstufe 9-11 Jahre) rekrutiert. Entsprechend dem ISAAC II-Studienprotokoll wurden diese Kinder mittels standardisiertem Elternfragebogen, Hautuntersuchung, Skin-Prick-Test, Spirometrie und bronchialem Provokationstest sowie einer venösen Blutentnahme untersucht (WEILAND et al. 2004).

Unter ähnlichen Bedingungen wurden in denselben Jahren auch in Leipzig Schulkinder der 4. Klasse für eine weitere Studie im Bereich Asthmaforschung rekrutiert und untersucht (VON MUTIUS et al. 1998). Auf die Unterschiede zum ISAAC II-Protokoll wird im Weiteren noch eingegangen.

Diese Studienpopulation stand für die vorliegende Doktorarbeit zur Verfügung.

### 2.1.2.1 Querschnittpopulation München und Dresden:

Für die Querschnittpopulation wurden sämtliche rekrutierte Kinder deutscher Abstammung aus den Städten München und Dresden erfasst, unabhängig von einer möglicher asthmatischen oder atopischen Erkrankung. Hierfür wurden in München und Dresden nur diejenigen Kinder inkludiert, bei denen ebenfalls DNA vorhanden war (München n=1159, Dresden n=1940).

### 2.1.2.2 Fall-Kontroll-Population (MDL 1872):

Um die Aussagekraft bezüglich eines Effektes auf den Phänotyp Asthma eingehender untersuchen zu können, wurde eine Asthma-Fall-Kontroll-Population aus der ISAAC-Studie nach definierten Kriterien ausgewählt. Diese umfasst insgesamt 1872 Kinder (gesamt N=1872, München n=690, Dresden n=789, Leipzig n=393).

Dafür wurde eine Population in einem 1:2- Verhältnis bestehend aus Fällen mit der Arzt Diagnose Asthma und/ oder bronchialer Hyperreaktivität (BHR) und Kontrollen mit Nicht-Asthmatikern, Nicht-Atopikern ohne Diagnose von BHR (super-normale Kinder) zusammengestellt. Lediglich Kinder deutscher Herkunft, für die sowohl DNA als auch Daten zum Immunglobulin E- (IgE-) Spiegel vorlagen, wurden bei der Auswahl aus der Querschnittpopulation von ISAAC II (Dresden, München) und Leipzig berücksichtigt.

Die genauen Kriterien und die Zusammensetzung der Fall- bzw. Kontroll-Gruppe kann der folgenden Darstellung entnommen werden:

#### 1. Fälle: Total **n=624**

Kinder mit der Arzt Diagnose Asthma und/ oder positiver BHR

München	n=230
Dresden	n=263
Leipzig	n=131

#### 2. Kontrollen: Total **n=1248**

Kinder mit

- a) Asthmadiagnose negativ + BHR negativ + IgE-Spiegel  $\leq 50$  + Hauttest negativ

München	n=174
Dresden	n=276
Leipzig	n=262 von 377 (Zufallsstichprobe)

oder (wenn keine Lungenfunktionstestung durchgeführt worden war und somit keine Angaben über BHR gemacht werden konnte)

b) Asthmadiagnose negativ + IgE-Spiegel=50 + Hauttest negativ

München n= 286 von 296

Dresden n=250 von 383 (Zufallsstichproben)

### 2.1.2.3 Fragebogen

Die standardisierten Fragebögen wurden über die Schulen an die Eltern der Kinder ausgeteilt und beinhalteten detaillierte Fragen zum Auftreten und der Schwere von atopischen Symptomen, wie z.B. pfeifende Atmung, Luftnot, atopisches Ekzem, allergischer Rhinitis. Neben Angaben zur pulmonalen Krankengeschichte des Kindes und deren Behandlung, wurden Informationen über weitere Erkrankungen im Kindesalter, Impfungen, Schwangerschaft, Geburt mit anschließender Ernährung, Familienanamnese und Fragen zum früheren und jetzigen sozioökonomischen Status und Lebensstil erhoben.

### 2.1.2.4 Skin-Prick-Test

Sechs häufige Aeroallergene sowie eine Positiv- und Negativkontrolle (Histamin; 10 mg/ml bzw. NaCl) wurden für den Haut-Prick-Test verwendet. Während das ISAAC-Protokoll für die Kinder in München und Dresden die Testung auf *Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae*, Katzenhaar, *Alternaria tenuis*, Baum- und Gräserpollen unter Verwendung von Extrakten der Firma ALK (Horsholm, Dänemark) beinhaltete, wurde in Leipzig auf *Dermatophagoides pteronyssinus*, Gras, Birken- und Haselnusspollen, Katzen- und Hundehaare untersucht (Stallerkit, Stallergènes, Frankreich). Für die Auswertung des Prick-Testes war die Größe der jeweils entstandenen Quaddel an der Auftragsstelle verglichen mit der Negativkontrolle ausschlaggebend. Eine Hautquaddel >3mm (nach Abzug der Negativ-Kontrolle) wurde als eine positive allergische Reaktion gewertet.

### **2.1.2.5 Spirometrie und bronchialer Reiztest**

Sowohl in Leipzig also auch in München bzw. Dresden wurde eine Basis-Lungenfunktionsprüfung mittels Spirometrie durchgeführt.

Für die Messung einer bronchialen Hyperreaktivität (BHR) wurde im Provokationstest in Leipzig trockene, kalte Luft (-15°C, gemessen am Mundstück) verwendet. Eine dabei gemessene FEV1 unter der 95%ten Perzentile der Gesamtpopulation wurde als Zeichen für BHR (positives Testergebnis) gewertet.

Anders als in Leipzig sah das ISAAC-Protokoll eine Stimulation mit hyperosmolarer (4,5%) Kochsalzlösung unterschiedlich langer Inhalationsdauer vor. So inhalierten die Kinder für 0,5, 1, 2, 4 und 8 Minuten den vernebelten Kochsalzdampf. Die FEV1 wurde dann eine Minute nach jeder Inhalationsperiode gemessen. Ein Abfall der FEV1 vom vorher ermittelten Wert unter Normalbedingungen von  $\geq 15\%$  wurde als ein positives Testergebnis angesehen. War der Abfall der FEV1 geringer, so wurde die Dauer der Inhalationsperiode verdoppelt oder die Messung bei gleicher Expositionsdauer wiederholt. Alle Kinder, die unter einer ständigen Asthmatherapie standen, wurden aufgefordert, für den Tag der Spirometrie mit ihrer Medikation auszusetzen, um das Ergebnis nicht zu verfälschen.

### **2.1.2.6 Blutprobe und deren weitere Verwendung**

Für die Bestimmung des Immunglobulin E -Spiegels wurde eine venöse Blutentnahme durchgeführt. Aus EDTA-Blut konnte DNA isoliert und aufgereinigt werden (siehe 2.3.1). Der DNA-Gehalt wurde photometrisch gemessen. Die Methode der Primer Extension Preamplification (PEP) wurde angewendet, um die Quantität der DNA zu erhöhen (siehe 2.3.5).

### 2.2 Material

#### 2.2.1 Geräte

DNA-Sequenzierer:

ABI 3730 DNA Analyzer 63920

Applied Biosystems, Weiterstadt, D

Gel-Dokumentationssystem:

KODAK Electrophoresis Documentation  
and Analysis System

KODAK, Stuttgart (Wangen), D

Gelelektrophoreseapparatur:

BIO RAD Wide Mini-Sub Cell GT

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

BIO RAD Power Pac 300

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Massenspektrometer:

BIFLEX II-TOF

Bruker Franzen Analytik GmbH,  
Bremen, D

Mikrowelle:

Bosch, Stuttgart, D

PCR-System:

eppendorf Mastercycler

Eppendorf AG, Hamburg, D

PCR PTC 225 Tetrad, Peltier Thermal Cycler

MJ Research, Boston, USA

Pipettierroboter:

Pipettierroboter Genesis 150

Tecan AG, Crailsheim, D

Pipettierroboter Multimek 96

Beckmann/Sagoin, Unterschleißheim, D

Sequenom Spectro Point Nanoliter

Pipetting Systems

Sequenom, Hamburg, D

Pipettierroboter Te-MO

Tecan AG, Crailsheim, D

Photometer:

eppendorf BioPhotometer

Eppendorf AG, Hamburg, D



### Pipetten:

eppendorf Research 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl      Eppendorf AG, Hamburg, D

### Tischzentrifuge:

Hettich Zentrifugen Mikro 20      Hettich GmbH, Tuttlingen, D

### Vortexer:

Scientific Industries Vortex Genie 2      Scientific Industries, Inc., NY, USA

### Waage:

Kern 440-33      Kern, Ballingen, D

### Wasserbad:

Köttermann Labortechnik      Köttermann GmbH, Uelze, D

### Zentrifuge:

eppendorf Centrifuge 5810 R      Eppendorf AG, Hamburg, D

## 2.2.2 Computerprogramme

### Pipettierroboter:

Gemini 3.5      Tecan, Crailsheim, D

Bioworks      Beckmann Coulter, Fullerton, USA

### MALDI-TOF Massenspektrometrie:

Spectro TYPER\_RT 2.0.0.3      SEQUENOM, San Diego, CA, USA

- Spectro-Designer
- Spectro-Importer
- Spectro-Typer

### Sequenzierung:

DNA Sequencing Analysis Software      Applied Biosystems, Weiterstadt, D  
Version 3.6.1

3100 Data Collection Software Version      Applied Biosystems, Weiterstadt, D

### Primer und PCR-Bedingungen:

Netprimer	Premierbiosoft International Palo Alto, CA, USA
SpectroDESIGNER	SEQUENOM, San Diego, CA, USA

### Analyse genomischer DNA-Sequenzen:

BioEditSequence Alignment Editor	Hall 1999, <a href="http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html">http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html</a>
Haploview	<a href="http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview">http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview</a>

### Datenbanken aus dem Internet:

National Center for Biotechnology Information	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
CHIP Bioinformatics Tools	<a href="http://snpper.chip.org/bio/">http://snpper.chip.org/bio/</a>
MAT-Inspector	<a href="http://www.genomatix.de/">http://www.genomatix.de/</a>

### Statistische Programme:

SAS/ Genetics (Version 9.13)	SAS Institute Inc., NC, USA
Vista Browser	<a href="http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml">http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml</a>

## 2.2.3 Puffer, Lösungen, Reagenzien

### Puffer, Lösungen, Reagenzien für die DNA-Extraktion:

Ery-Lyse-Puffer pH=7,4 (155mM NH<sub>4</sub>CL (Merck, Darmstadt, D), 10mM KHCO<sub>3</sub> (Merck, Darmstadt, D), 0,5M EDTA pH=8 (Sigma-Aldrich, Osterode, D), ad H<sub>2</sub>O)

Proteinase-K-Puffer (1M Tris/CL pH=7,5 (Sigma-Aldrich, Osterode, D), 0,5M EDTA pH=8 (Sigma-Aldrich, Osterode, D), 5M NaCl (Sigma-Aldrich, Osterode, D)

SDS 20% (Na-Dodecylsulfat, Serva, Heidelberg, D)

EtOH 100% (Ethanol absolut zur Analyse, Merck, Darmstadt, D)

## MATERIAL UND METHODEN

---

TE-Puffer (10mM Tris/CL (Sigma-Aldrich, Osterode, D), 1mM EDTA pH=8 (Sigma-Aldrich, Osterode, D))

Puffer, Lösungen, Reagenzien für die PCR:

10xPuffer S	PeqLab Erlangen, D
10xPuffer Y	PeqLab, Erlangen, D
MgCl <sub>2</sub> 25mM	Promega GmbH, Mannheim, D
Betain 5M	Sigma-Aldrich, Osterode, D
H <sub>2</sub> O, Water Molecular Biology Grade	Eppendorf AG, Hamburg, D
dNTP-Set, je 100mM	PeqLab, Erlangen, D

Puffer, Lösungen, Reagenzien für die Sequenzierung:

10x PCR Buffer containing 15mM MgCl <sub>2</sub>	Quiagen, Hilden, D
LiChrosolv, H <sub>2</sub> O, HPLC grade	Merck, Darmstadt, D
FG, 3100 POP6 Sequenziergel	Applied Biosystems, Weiterstadt, D
ABI Sequenzierpuffer	Applied Biosystems, Weiterstadt, D

Puffer, Lösungen, Reagenzien für die MALDI-TOF:

10x PCR Puffer enthält 15mM MgCl <sub>2</sub>	Quiagen, Hilden, D
4x dNTPs	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
MgCl <sub>2</sub> 25mM	Quiagen, Hilden, D
MassExtend Nucleotide Mix Pack Tri 25	SEQUENOM, San Diego, CA, USA
MassExtend Nucleotide Mix Pack Tri 26	SEQUENOM, San Diego, CA, USA
MassExtend Nucleotide Mix Pack Tri28	SEQUENOM, San Diego, CA, USA
HME MassEXTEND Nucleotide Tri-Mix-Pack	SEQUENOM, San Diego, CA, USA

3-Punkt Kalibrant	SEQUENOM, San Diego, CA, USA
hME-Puffer	SEQUENOM, San Diego, CA, USA
Spectro CLEAN	SEQUENOM, San Diego, CA, USA

Puffer, Lösungen, Reagenzien für die DNA-Gelelektrophorese:

100bp DNA-Leiter 500µg/ml	New England Biolabs, Frankfurt a. Main, D
SeaKem LE Agarose	Cambrex Bioscience Rockland, ME, USA
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Osterode, D
Ladepuffer (30% Glycerin, Bromphenolblau, Xylenecyanol-FF)	
5% TBE-Puffer (54g Tris-Puffer, 27,5g Borsäure, 20ml 0,5M EDTA (pH=8), ad 1l H <sub>2</sub> O)	

### 2.2.4 Reaktionskits

PCR-Aufreinigung:

Millipore Kit PCR Multiscreen, Montage 96PCR Plates	Millipore, D
QIAquick Gel Extraction Kits	Quiagen, Hilden, D

Sequenzierkits:

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt, D
---	---------------------------------------

MALDI-TOF Massenspektrometrie:

MassEXTEND Core Kit	SEQUENOM, San Diego, CA, USA
---------------------	---------------------------------

### 2.2.5 Enzyme

Polymerasen:

Taq Polymerase	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Thermosequenase	Amersham Bioscience, Freiburg, D
HotStar Taq (5units/µl)	Quiagen, Hilden, D

sonstige Enzyme:

Proteinase K

Sigma-Aldrich, Osterode, D

Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)

Amersham Bioscience, Freiburg, D

### 2.2.6 Primer

PCR-Primer:

bezogen von Metabion (Planegg/Martinsried, D), siehe Tabelle 7 unter 2.3.9

PEP-Primer:

N15-Primer von Metabion (Planegg/Martinsried, D)

Sequenzier-Primer:

bezogen von Metabion (Planegg/Martinsried, D), siehe Tabelle 8 unter 2.3.9

MALDI-TOF-Primer:

Sense-/ Antisense-/ Extensions-Primer von Metabion (Planegg/Martinsried, D),  
siehe Tabelle 11 unter 2.3.11.3

### 2.2.7 Sonstige Materialien

Thermo-Fast 96 PCR Plates (Low Profile)

Peqlab, Erlangen, D

Mikrotiterplatten

Applied Biosystems,  
Weiterstadt, D

Thermofast 384 MTP

ABgene, Surrey, UK

96-er Custerplates

Quiagen, Hilden, D

### 2.3 Methoden

#### 2.3.1 DNA-Extraktion

Unter Anwendung einer Standardaussalzmethode nach Miller (MILLER et al. 1988) wurde DNA aus EDTA-Blut extrahiert und aufgereinigt. Hierbei wurden die einzelnen Blutproben zunächst mit Ery-Lyse-Puffer versetzt. Nach Ablauf von mindestens 10 min zeigte das Klarwerden der vorher trüben Lösung den vollständig abgelaufenen Ery-Lyse-Vorgang an. Durch anschließende Zentrifugation für eine Dauer von 10 Minuten bei 500 rcf bildeten sich am Boden der Probengefäße sichtbare Leukozytenpellets. Diese wurden nach Abschütten des Überstandes resuspendiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Die Proben wurden nach Zugabe von 5 ml Proteinase K-Puffer, 25µl Proteinase K und 250µl 20% SDS über Nacht im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Proben nach erfolgter Leukozyten-Lyse durch Zugabe von je 1500µl NaCl 0,9%ig und Vortexen erneut durchmischt und für 30 Minuten bei 3200 rcf zentrifugiert. Die im Überstand enthaltende DNA wurde durch Abpipettieren in frische Reaktionsgefäße überführt und durch Zugabe von je 20 ml 100% Ethanol anschließend gefällt. Daraufhin folgte ein Waschschriff des DNA-Pellets mit 70% Ethanol, welches nach erfolgter Zentrifugation für etwa 15 min bei Raumtemperatur getrocknet und je nach Menge der gefällten DNA in etwa 150 µl TE-Puffer gelöst wurde. Die so extrahierte DNA wurde für die anschließenden Verwendungszwecke bei 4°C gelagert.

#### 2.3.2 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

Nach der DNA-Isolierung bzw. nach einer PCR war es notwendig, die Konzentration der Nukleinsäure-Lösung zu bestimmen, um für nachfolgende Versuche definierte DNA-Mengen einsetzen zu können.

Die Konzentration einer DNA-Lösung wurde bestimmt, indem ihre Extinktion im Spektralphotometer nach geeigneter Verdünnung (1:15) bei 260 nm (DNA) und 280 nm (Protein) ( $OD_{260}$ ,  $OD_{280}$ ) gemessen und die Konzentration nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet wurden. Die Messung der  $OD_{280}$  erfasste Verunreinigungen und diente der Überprüfung des Reinheitsgrades. Das Verhältnis von  $OD_{260}/OD_{280}$  gibt den Grad der Verunreinigung an und sollte im Idealfall etwa 1,7 – 2,0 betragen. Werte  $\leq 1,6$  deuten auf einen hohen Proteingehalt oder Verunreinigung hin, wohingegen Werte  $\geq 2,0$  auf einzelsträngige DNA schließen lassen (hyperchromer Effekt).

### 2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR handelt es sich um eine Methode zur Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte (Mullis, K 1984, Literatur). Ein Reaktionsansatz besteht aus zwei spezifischen Oligonukleotidprimern, hitzestabiler *Taq*-Polymerase, den vier Desoxynukleosidtriphosphaten dATP, dCTP, cGTP und cTTP, dem DNA-Template und geeigneten Pufferbedingungen. Die Reaktion beginnt mit der thermischen Denaturierung (95°C) eines DNA-Strangs. Die beiden Varianten von Oligonukleotidprimern, die im Überschuss im Reaktionsansatz verwendet werden, sind so gewählt, dass auf Grund deren Sequenz sich sowohl der zum Gegenstrang komplementäre „Sense“-Primer als auch der zum Sinnstrang komplementäre „Antisense“-Primer an den jeweiligen DNA-Abschnitt anlagern können. Diese Anlagerung (Annealing) der Oligonukleotide an den jeweiligen Strang findet nach der Denaturierung statt, wenn das Reaktionsgemisch etwas abgekühlt ist. Die Oligonukleotide stellen das freie 3'OH-Ende für die anschließende DNA-Synthese bereit, die durch die *Taq*-Polymerase katalysiert wird. Der zwischen diesen Primerpaaren liegende DNA-Abschnitt kann nur mit Hilfe von dNTPs unter katalytischer Wirkung der *Taq*-Polymerase, deren Temperaturoptimum bei 72°C liegt, vervielfältigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR eingesetzt, um ausgewählte Fragmente des CLNS1A-Gens zu vervielfältigen und somit einer späteren Sequenzierung zur Bestimmung der genauen Basenabfolge sowie zur Identifizierung möglicher genetischer Variationen zugänglich zu machen. Durch direkte Sequenzierung sollten 2000 bp des proximalen Promotors, alle Exons einschließlich je 500 bp der flankierenden Region und 1000 bp der proximalen 3' UTR (untranslated region) untersucht werden. Entsprechend wurden mit Hilfe des Programms Netprimer 27 genspezifische Primerpaare entworfen und von der Firma Metabion synthetisiert. Somit konnten 27 Fragmente amplifiziert und später sequenziert werden, wobei sich direkt benachbarte Fragmente überlappten. In Tabelle 7 sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide mit ihren optimalen PCR-Bedingungen aufgelistet. Ein Standard-PCR-Ansatz wurde immer nach dem in Tabelle 1 aufgeführten Schema pipettiert und unter den in Tabelle 2 allgemein beschriebenen Temperaturbedingungen in einem Thermocycler durchgeführt. DNA der unter 2.1.1 beschriebenen Population wurde verwendet.

**Tabelle 1: Komponenten eines PCR-Ansatzes**

Komponenten	Volumen	Konzentration der Stammlösung
<i>DNA-Template</i>	3,5 µl	(20 ng/µl)
<i>dNTP-Mix</i>	1,0 µl	(je 10 mM)
<i>PCR-Puffer (Puffer s / Puffer y)</i>	5 µl	10 x
<i>Vorwärtsprimer</i>	1,0 µl	(25 µM)
<i>Rückwärtsprimer</i>	1,0 µl	(25 µM)
<i>Taq-DNA-Polymerase</i>	0,3 µl	(5 U/µl)
<i>Weitere Zusätze (MgCl<sub>2</sub>/Betain)</i>	x µl (siehe Tab.7)	25 mM/ 5 M
<i>H<sub>2</sub>O</i>	ad 50 µl	

**Tabelle 2: Allgemeine Temperaturbedingungen einer PCR**

Temperatur	Zeit
96 °C	1 min
96°C ( <i>Denaturierung</i> )	10 sec
53 °C – 66 °C * ( <i>Annealing</i> )	20 sec
72 °C ( <i>Extension</i> )	10 sec
72 °C	2 min
4 °C	unendlich

\* variabel, je nach spezifischen Fragmentbedingungen zwischen 53°C und 66°C



### 2.3.4 Nested PCR

In einigen Fällen (Fragment 3a und 16) musste das Prinzip der Nested PCR angewendet werden, um ein optimales PCR-Produkt zu erhalten. Hierbei wird zunächst ein größeres DNA-Stück mit PCR amplifiziert (long-fragment-PCR), welches dann in einer zweiten PCR als Template mit den entsprechenden Primern eingesetzt wird.

Die Bedingungen für die long-fragment-PCR sind in Tabelle 3 und 4 aufgeführt, die für die eigentlichen Fragmente 3a und 16 können der Tabelle 7 entnommen werden.

**Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Primerpaare und deren PCR-Bedingungen für die long-Fragment-PCR**

Long-Fragment	Name	Fragment-Länge	Annealing-Temperatur	Zyklen-Zahl	Puffer	Weitere Zusätze in µl
3a	CLN_2_424fwd	1333 bp	59°C	38	Puffer y	0,6 Betain
	CLN_4_1757rev					
16	CLNS1A_15_16632fwd	978 bp	62°C	35	Puffer s	0,6 MgCl
	CLNS1A_16_17610rev					

**Tabelle 4: Allgemeine Temperaturbedingungen für die long-fragment-PCR**

<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>
96 °C	1 min
96°C ( <i>Denaturierung</i> )	30 sec
59 °C / 62 °C ( <i>Annealing</i> )	30 sec
72 °C ( <i>Extension</i> )	45 sec
72 °C	5 min
4 °C	unendlich

### 2.3.5 Primer Extension Preamplification (PEP)

Das Ziel der PEP-PCR ist die unspezifische Amplifikation des gesamten Genoms zur Steigerung der DNA-Quantität. Dies ist vor allem im Rahmen genetischer Forschung wichtig, um möglichst viel Arbeitsmaterial von einer individuellen DNA-Probe zu erhalten. Das Verfahren wurde erstmals im Jahre 1992 von Zhang et. al beschrieben (ZHANG et al. 1992). Bei der PEP-Reaktion handelt es sich um eine PCR (siehe 2.3.3), in die sogenannte N15-Primer für die Amplifikation des gesamten Genoms eingesetzt werden. N15-Primer sind eine Mischung unterschiedlicher Primer mit jeweils einer Länge von 15 Basen, deren Basenabfolge randomisiert wurde. Auf Grund der unspezifischen Sequenz dieser Primer kommt es bei der PEP-Reaktion zur zufälligen Anlagerung am gesamten komplementären DNA-Strang der eingesetzten Probe. Die Amplifikation findet dann zwischen den benachbarten, an den DNA-Strang angelagerten Primern statt. Die Regionen zwischen den Primern variieren in der Länge und können zum Teil auch überlappen. Da die Primer sich zufällig über den ganzen DNA-Strang verteilen, ist es mit dieser Methode möglich, das gesamte Genom zu amplifizieren. Mit einer 40-fachen Steigerung der DNA-Menge kann gerechnet werden.

Für die vorliegende Arbeit wurde die Methode der Primer Extension Preamplification eingesetzt, um den DNA-Gehalt aus den Blutproben der Studienpopulation (siehe 2.1.2) zu erhöhen, damit die einzelne DNA-Probe möglichst vielen genetischen Untersuchungen zugänglich gemacht werden konnte. Im Rahmen einer vorangegangenen Studie wurde die PEP-Reaktion der jeweiligen Proben bereits durchgeführt, da auf Grund des Populationsumfangs eine weitere Probenentnahme zu einem späteren Zeitpunkt nicht möglich war.

Der Standard-PEP-Ansatz wurde für einen 50 µl –Ansatz nach dem in Tabelle 5 aufgeführten Schema pipettiert und unter den in Tabelle 6 allgemein beschriebenen Temperaturbedingungen in einem Thermocycler durchgeführt. DNA der unter 2.1.2 beschriebenen Population wurde verwendet.

**Tabelle 5: Der Standard-PEP-Ansatz**

Komponenten	Volumen	Konzentration der Stammlösung
<i>DNA-Template</i>	1,0 µl	(5 ng/µl)
<i>dNTP-Mix</i>	5,0 µl	(je 2 mM)
<i>Puffer y</i>	5,0 µl	10x
<i>N15-Primer</i>	10,0 µl	(200 µM)
<i>Taq-DNA-Polymerase</i>	1,0 µl	(mind. 1 U/µl)
<i>MgCl<sub>2</sub></i>	5,0 µl	25 mM
<i>H<sub>2</sub>O</i>	23 µl	

**Tabelle 6: Allgemeine Temperaturbedingungen für die PEP-Reaktion**

Temperatur	Zeit
1) 94 °C	3 min
2) 94°C	1 min
3) 37°C	2 min
4) 37°C	1 sek + 0,2 °C/sek (Temp.inkrement) R=2,0°C/sek (Rampe)
5) Go to 4)	Repeat 90
6) 55 °C	4 min
7) go to 2)	Repeat 49
8) 72 °C	5 min
9) 4 °C	unendlich

Zur Überprüfung der Qualität der PEP-Reaktion wurden einige Proben auf einem 1%-igem Agarose-Gel aufgetragen (siehe auch 2.3.6) und zusätzlich eine Kontroll-PCR eines beliebigen Protokolls durchgeführt.

### 2.3.6 Gel-Elektrophorese von Nukleinsäuren in Agarose-Gelen

Zur Identifizierung, Reinigung und Kontrolle der DNA-Qualität von PCR-Produkten wurde eine elektrophoretische Auftrennung in entsprechenden Agarose-Gelen durchgeführt. Außerdem konnte mit dieser Methode eine Mengenabschätzung kleiner DNA-Mengen vorgenommen werden. Das Prinzip beruht auf der Tatsache, dass Nukleinsäuren unter neutralen pH-Bedingungen negative Ladungen besitzen und somit in einem elektrischen Feld wandern, wobei ihre Geschwindigkeit proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts ist.

In der Regel wurden 1,5%ige Agarose-Gele verwendet, für die in der Herstellung Agarose in 0,5%igem TBE-Puffer aufgeköcht und vor dem Erhärten in horizontale Schlitten gegossen wurde. Ein Kamm stellte Vertiefungen her für die aufzutragenden DNA-Lösungen. Die Zugabe des interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid zur aufgeköchten Agarose-Lösung ermöglichte eine Visualisierung der Nukleinsäuren unter UV-Licht (302 nm).

Durch Vergleich mit einem Längenstandard definierter Fragmentlängen (100 bp-Leiter) konnte die Länge von DNA-Molekülen abgeschätzt werden.

In einem 0,5%igem TBE-Laufpuffer wurden Aliquots der aufzutrennenden DNA-Lösung mit Ladepuffer versetzt und für 90 Minuten bei 90 Volt laufen gelassen. Diese wanderten ebenfalls zur Anode, wodurch sich der Verlauf der Trennung verfolgen ließ.

### 2.3.7 Gelextraktion

Das Prinzip der Gelextraktion wurde für das Fragment 1 angewendet, um ein optimales PCR-Produkt ohne weitere Nebenprodukte zu erhalten. Hierfür wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung des PCR-Amplifikationsproduktes die entsprechende Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits aufgereinigt. Hierbei wurden die Anweisungen des Herstellers befolgt.

### 2.3.8 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung der PCR-Produkte zur Sequenzierung erfolgte unter Verwendung von Filterplatten der Firma Millipore. Es handelt sich dabei um ein membrangebundenes Aufreinigungsverfahren, bei dem zunächst das PCR-Produkt unter Druckeinwirkung an eine Membran gebunden und später wieder in Wasser eluiert wird.

Nach Überführen des gesamten PCR-Produktes auf die Platte und Zugabe von je 250 µl Wasser, wurde die Platte bei 3200g für 7 Minuten zentrifugiert. Das PCR-Produkt konnte dann durch Vortexen in 30 µl Wasser eluiert und der Überstand abpipettiert werden.

### 2.3.9 Sequenzierung

Mit Hilfe der DNA-Sequenzierung kann die Nukleotidsequenz eines bestimmten Desoxyribonucleinsäure-(DNA-) Fragments entschlüsselt werden. In meinen Versuchen wurde dieses Verfahren eingesetzt, um unbekannte genomische Variationen, insbesondere Single-Nucleotid-Polymorphismen (SNPs) im CLNS1A-Gen, zu identifizieren.

Die angewandte Sequenziermethode beruht auf dem Sanger-Abbruch-Verfahren mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden (ddNTPs) (SANGER et al. 1977). Dabei werden terminale Didesoxynukleotide enzymatisch eingebaut, wodurch die Strangverlängerung mangels 3'-OH-Gruppe zum Erliegen kommt. Die Verwendung unterschiedlich markierter ddNTPs erlaubt die spätere automatische Analyse der verschieden langen Abbruchfragmente. Auf einem Kapillarsequenziergerät findet die Auftrennung der verschieden langen Fragmente in einer mit Acrylamid-Gel gefüllten Kapillare statt. An dieser liegt eine elektrische Spannung an, mit welcher die Fragmente elektrophoretisch nach der Größe aufgetrennt werden. Die Analyse der je nach Abbruchbase fluoreszenzmarkierten, unterschiedlich langen DNA-Fragmente findet durch einen Laser statt, welcher die Farbstoffe anregt und durch einen Detektor, der die davon ausgehenden Signale empfangen kann. Je nach Größe des zu sequenzierenden Moleküls werden unterschiedlich lange Kapillaren verwendet. So konnten in den Versuchen kurze PCR Produkte bis 500bp mit Hilfe von 36 cm langen Kapillaren analysiert werden, wohingegen für längere PCR Produkte die 50 cm langen Kapillaren verwendet werden mussten.

Der Reaktionsansatz enthielt 1-2 µl des zu sequenzierenden PCR-Produktes (25-50 ng/µl), 1,0 µl Premix (Big Dye), bestehend aus Polymerase, Puffer und fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden, 0,5 µl des entsprechenden Sequenzier-Primers (10 µM) und wurde mit pyrogenfreiem Wasser auf 5 µl aufgefüllt. Als Sequenzierprimer wurden die bereits verwendeten PCR-Primer benutzt. Auf Grund struktureller Sequenzbedingungen oder bei Vorliegen von Deletionen/ Insertionen konnten nicht alle Proben der 27 Fragmente nur in eine Richtung (5' → 3' oder 3' → 5') qualitativ gut ausgewertet werden. In diesen Fällen musste

## MATERIAL UND METHODEN

das Fragment von beiden Seiten sequenziert werden. Die verwendeten Sequenzier-Primer und die jeweilige Sequenzierrichtung kann Tabelle 8 entnommen werden.

**Tabelle 7: Übersicht über alle verwendeten Primerpaare, deren Sequenz, Fragmentlänge, Annealing-Temperatur, Zyklen-Zahl, verwendeter Puffer und eventuelle Zusätze (F=Fragment, L=Fragment-Länge, T=Annealing-Temperatur, Z=Zyklen-Zahl, fwd=forward, rev=reverse)**

F	Name	Sequenz	L	T(°C)	Z	Puffer	Weitere Zusätze in µl
1	CLN_1c_148fwd	Cgccaccacgccagg	382 bp	61	38	Puffer s	
	CLN_1a_529rev	gctctgcgtgaattactgt					
2	CLNS1A_2_424fwd	gggtgctgctgtaatggc	479 bp	62	35	Puffer y	1,2 MgCl
	CLNS1A_2_902rev	ctttgatccctgaatgctct					
3a	CLNS1A_3a_787fwd	gtgatctgccgcctcg	516 bp	65	30	Puffer y	
	CLNS1A_3a_1307rev	catctcccacccaaccaat					
4	CLNS1A_4_1243fwd	Aggatttggcagggtg	515 bp	63	38	Puffer y	
	CLNS1A_4_1757rev	ataactgagacactgaaagcg					
5	CLNS1A_5_1661fwd	ttagttcagcctatatccagc	536 bp	63	35	Puffer y	1,2 MgCl
	CLNS1A_5_2195rev	tacctctcagcgatgaaag					
6	CLNS1A_6_2046fwd	Ctgtgttggccactct	522 bp	63	35	Puffer y	0,6 Betain
	CLNS1A_6_2567rev	cgccagacctccagtaaat					
6a	CLNS1A_6a_2540fwd	aactcgcttattactggag	148 bp	58	38	Puffer s	
	CLNS1A_6a_2687rev	cacagtgcgctctgaaac					
7	CLNS1A_7_9421fwd	ctgtccgatagttcacattcc	499 bp	63	35	Puffer s	0,6 MgCl
	CLNS1A_7_9920rev	aatcctaattcagagccatc					
8a	CLNS1A_8a_9826fwd	gtggtcttacatgaggatttac	547 bp	58	38	Puffer y	
	CLNS1A_8a_10372rev	ttagacggagctcactttg					
9	CLNS1A_9_13274fwd	ctgccaccacgccttgc	485 bp	66	35	Puffer y	0,6 Betain
	CLNS1A_9_13758rev	gcctcccaaagtgcctccc					
10a	CLNS1A_10a_13637fwd	acaagtcaccagctcagaa	480 bp	53	38	Puffer s	
	CLNS1A_10a_14116rev	ggaatgcttggatgtgaaa					
11	CLNS1A_11_14004fwd	acagtgatgatgatgtgaacc	480 bp	66	35	Puffer y	/
	CLNS1A_11_14483rev	gggtcagagctcctgtaaga					
12	CLNS1A_12_14395fwd	atctcaggatggctggaag	409 bp	62	35	Puffer y	
	CLNS1A_12_14803rev	tattcttctcctcgtagtcac					
13a	CLNS1A_13a_14707fwd	gttcagt ggaggcaatg	473 bp	62	38	Puffer y	1,2 Betain
	CLNS1A_13a_15179rev	gaggtcgggagttcaag					
14a	CLNS1A_14a_14894fwd	ggtagagattatagttcttat	496 bp	57	40	Puffer s	
	CLNS1A_14_15389rev	ccattttcttctcccata					
15	CLNS1A_15_16632fwd	tggacttgggattcttgg	548 bp	65	34	Puffer y	1,2 MgCl
	CLNS1A_15_17179rev	ccttctgctgttagatggg					
16	CLNS1A_16_17105fwd	tttagaacaaggacagcgg	506 bp	64	40	Puffer s	
	CLNS1A_16_17610rev	cctagcaactaatacacagag					
17	CLNS1A_17_17315fwd	atgagcacttggcgcaataa	491 bp	56	35	Puffer s	
	CLNS1A_17_17805rev	gccagccttcagtcacg					
18	CLNS1A_18_19557fwd	tcagttacctcccaccaga	509 bp	61	35	Puffer s	
	CLNS1A_18_20066rev	tgagcaatccctatgaacac					
19	CLNS1A_19_19982fwd	tcttaccagcagaggcca	550 bp	61	40	Puffer s	
	CLNS1A_19_20531rev	ccagatacagtggtcacag					
20	CLNS1A_20_20377fwd	gcacatgcttaccacacc	388 bp	64	38	Puffer y	
	CLNS1A_20_20764rev	gggagacagggacaacaa					
21	CLNS1A_21_22543fwd	atgtgccaccacgcctg	482 bp	64	38	Puffer y	3,0 Betain
	CLNS1A_21_23024rev	atgcctagtcacgagtgcc					
22	CLNS1A_22_22928fwd	catctgtaaaatggggagg	534 bp	61	38	Puffer y	
	CLNS1A_22_23461rev	aacatggcgaaaggagc					
23	CLNS1A_23_23341fwd	attcctaccttgactgtgtg	487 bp	63	38	Puffer y	
	CLNS1A_23_23837rev	gaagtggcagaaatcccc					
24	CLNS1A_24_23685fwd	taatgctggcaaatatgag	547 bp	55	36	Puffer s	
	CLNS1A_24_24231rev	agtggttagtacagaggtctc					
25	CLNS1A_25_24124fwd	cttttctaaccagactctcag	538 bp	61	38	Puffer y	
	CLNS1A_25_24661rev	atgttcattggaagtcacaa					
26a	CLNS1A_26a_10173fwd	catctggctaatcacggt	354 bp	57	40	Puffer s	
	CLNS1A_26_10526rev	atatacagacacacatgaacac					

**Tabelle 8: Verwendete Sequenzierprimer (fwd=forward, rev=reverse)**

Fragment	Primernamen	Primersequenz	Sequenzrichtung
1	CLNS1A_1c_148fwd	cgccaccacgccagg	5' → 3'
2	CLNS1A_2_424fwd	gggtgctgctgtaatggc	5' → 3'
3a	CLNS1A_3a_1307rev	catctcccaccaaccaat	3' → 5'
4	CLNS1A_4_1243fwd	aggataatttggcaggttg	5' → 3'
5	CLNS1A_5_1661fwd	ttagttcagcctatatccagc	5' → 3'
6	CLNS1A_6_2046fwd	ctgtgttgcgcactct	5' → 3'
6a	CLNS1A_6a_2687rev	cacagtcggctctgaaac	3' → 5'
7	CLNS1A_7_9421fwd	ctgtccgatagttcacattcc	5' → 3'
	CLNS1A_7_9920rev	aatcctaaccagagccatc	3' → 5'
8a	CLNS1A_8a_9826fwd	gtggtcttacatgaggatttac	5' → 3'
9	CLNS1A_9_13274fwd	ctgccaccacgccttgc	5' → 3'
10a	CLNS1A_10a_13637fwd	acaagtcacagtcctcagaa	5' → 3'
11	CLNS1A_11_14004fwd	acagtgatgatgatgtgaacc	5' → 3'
	CLNS1A_11_14483rev	gggtcagagtcctggtaaga	3' → 5'
12	CLNS1A_12_14803rev	tattcttctccgtcgtatcat	3' → 5'
13a	CLNS1A_13a_14707fwd	gttcagtggaggcaatg	5' → 3'
	CLNS1A_13a_15179rev	gaggtcgggagttcaag	3' → 5'
14a	CLNS1A_14a_14894fwd	ggtagaggattatagtctttat	5' → 3'
	CLNS1A_14_15389rev	ccattttcttctcccata	3' → 5'
15	CLNS1A_15_16632fwd	tggacttgggattcttgg	5' → 3'
	CLNS1A_15_17179rev	ccttctgctgttagatggg	3' → 5'
16	CLNS1A_16_17105fwd	tttagaacaaggacagcgg	5' → 3'
	CLNS1A_16_17610rev	cctagcaaaactaatacacagatg	3' → 5'
17	CLNS1A_17_17315fwd	atgagcacttgggcaataa	5' → 3'
	CLNS1A_17_17805rev	gccagccttcagtcacg	3' → 5'
18	CLNS1A_18_20066rev	tgagcaatccctatgaacac	3' → 5'
19	CLNS1A_19_19982fwd	tcttaccagcagagggca	5' → 3'
	CLNS1A_19_20531rev	ccagatacagtggtcacag	3' → 5'
20	CLNS1A_20_20377fwd	gcacatgcttaccacacc	5' → 3'
21	CLNS1A_21_22543fwd	atgtgccaccacgcctg	5' → 3'
22	CLNS1A_22_22928fwd	catctgtaaaatggggagg	5' → 3'
23	CLNS1A_23_23341fwd	attcctaccttgactgtgtg	5' → 3'
	CLNS1A_23_23837rev	gaagtggcagaaatcccc	3' → 5'
24	CLNS1A_24_23685fwd	taatgctggcaaatatgag	5' → 3'
25	CLNS1A_25_24661rev	atgttcattggaagtcacaa	3' → 5'
26a	CLNS1A_26a_10173fwd	catcctggctaatacgggt	5' → 3'
	CLNS1A_26_10526rev	atatacagacacatgaacatc	3' → 5'

Die Sequenzier-Reaktion wurde mit 28 Zyklen in einem Thermocycler in Low profil Platten (Firma Peqlab) nach folgendem Programm durchgeführt:

**Tabelle 9: Allgemeine Temperaturbedingungen für die Sequenzierreaktionen**

<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>
95 °C ( <i>Denaturierung</i> )	30 sec
50°C ( <i>Annealing</i> )	15 sec
60 °C ( <i>Extension</i> )	4 min
4 °C	hold

Nach erfolgter Sequenzierreaktion wurden die Sequenzierprodukte für die abschließende Fällung und Reinigung mit je 100µl 70 %igem EtOH (Raumtemperatur) versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der anschließenden Zentrifugation (3000g für 30 Minuten) bildeten sich DNA-Pellets am Plattenboden. Der Überstand wurde verworfen und ein zweiter Reinigungs- (je 150µl 70 %iger EtOH) und Zentrifugationsschritt (3000g für 10 Minuten) durchgeführt. Nach Abkippen der Flüssigkeit schloss sich ein 5-minütiges Trocknen der DNA-Pellets bei Raumtemperatur an.

Die so aufgereinigten Sequenzierprodukte wurden in je 50 µl HPLC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und 25µl dieses Eluates in spezielle Mikrotiterplatten überführt. Die Auftrennung der Sequenzierprodukte fand unter Standardbedingungen statt.

### 2.3.10 Auswertung der Sequenzen

Die Auswertung der Sequenzen erfolgte unter zu Hilfenahme des Sequenz-Analyse-Programms BioEditSequence Alignment Editor. Lediglich Sequenzen mit eindeutigen Signalen wurden verwendet. Durch direkten Vergleich der zu untersuchenden Sequenzen mit einer Referenzsequenz (NT\_033927, Gene ID 1207) aus der genomischen Datenbank des National Center for Biotechnology Information konnten genetische Variationen im CLNS1A-Gen identifiziert werden.



### 2.3.11 Genotypisierung mittels MALDI-TOF MS

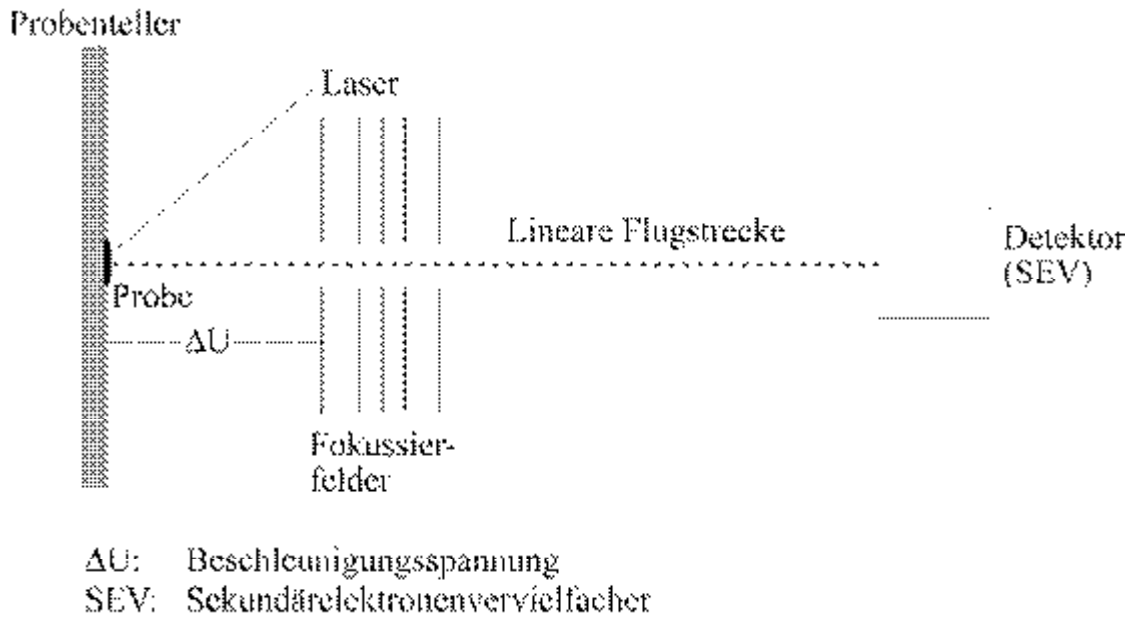
#### 2.3.11.1 Theoretische Grundlagen

Bei der matrixunterstützten Laser Desorption/ Ionisation (MALDI) wird die zu untersuchende Probe mit dem 100- bis 1000fachen Überschuss an Matrix versetzt, auf einem Probenhalter co-kristallisiert und anschließend im Hochvakuum des Massenspektrometers einem intensiven Laserimpuls von wenigen Nanosekunden Dauer ausgesetzt (KARAS und HILLENKAMP 1988; KIRPEKAR et al. 1998).

Aufgrund der Entwicklung der MALDI-TOF Massenspektrometer ist es möglich, DNA-Fragmente in einer Größenordnung von 1000 bis 9000 Da, d.h. 3-30 Basen, mit einer Genauigkeit von 0,1 % bis 0,01 % zu bestimmen, womit sich ein Massenbereich erschließt, in dem eine SNP-Analyse (SNP = Single Nucleotide Polymorphism) mittels Primer-Extensionsprodukten durchgeführt werden kann (GRIFFIN und SMITH 2000; LEUSHNER 2001; PUSCH et al. 2002; STORM et al. 2003).

Das von Hillenkamp und Karas (KARAS und HILLENKAMP 1988; KARAS et al. 1991) sowie Tanaka (TANAKA et al. 1988) eingeführte matrixunterstützte Laserdesorptionsverfahren (Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization Time-Of-Flight), hat in den letzten Jahren zur Entwicklung von effektiven Hochdurchsatzmethoden geführt, mit deren Hilfe DNA-Variationen im Erbgut schnell und präzise detektiert werden können (GRIFFIN und SMITH 2000; LEUSHNER 2001; PUSCH et al. 2002; STORM et al. 2003). Die am weitesten für die Genotypisierung von Einzelbasenaustausch optimierte, auf MALDI-TOF MS basierende Methode ist die Primer-Extensions-Reaktion. Hier entstehen durch eine Primer-Verlängerung (Primer-Extension), SNP-spezifische Primer-Extensionsprodukte, die sich aufgrund ihres unterschiedlichen Gewichts massenspektrometrisch unterscheiden lassen (GRIFFIN und SMITH 2000). Um einen Einzelbasenaustausch mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie detektieren zu können, ist es notwendig, den genomischen Bereich, in dem sich der SNP befindet, mit der PCR zu amplifizieren. Dabei werden die Primer so gewählt, dass PCR-Amplifikate entstehen, die ca. 100 bp groß sind, um eine möglichst hohe PCR-Effizienz zu erzielen. Anschließend werden die so generierten PCR-Produkte für die Primer- Extensionsproduktion als Ausgangsprodukt eingesetzt. Die SNP-spezifische Extension nach der hME-Methode (Homogeneous-Mass-Extent<sup>TM</sup>) wird für die Bestimmung von Allelfrequenzen und für die Einzelgenotypisierung eine Platte für 384 Reaktionen verwendet (LITTLE et al. 1997; DING und CANTOR 2003; HARTMER et al. 2003).

**Abbildung 10:** Schematischer Aufbau eines MALDI-TOF-Massenspektrometers (nach GRIFFIN and SMITH 2000) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. H. Gohlke, GSF, München)



## 2.3.11.2 Vorbereitung der Platten für die MALDI-TOF

Zunächst wurde die genomische DNA der Studienpopulation (siehe 2.1.2) nach einem vorgegebenen Schema (siehe Abb.11) sortiert. Dabei wurden zur Qualitätssicherung vier Negativkontrollen pro 96-er-Platte eingefügt, um Drehungen der Probenplatten ausschließen zu können.

**Abbildung 11:** Kontrollschema; NK=Negativkontrolle

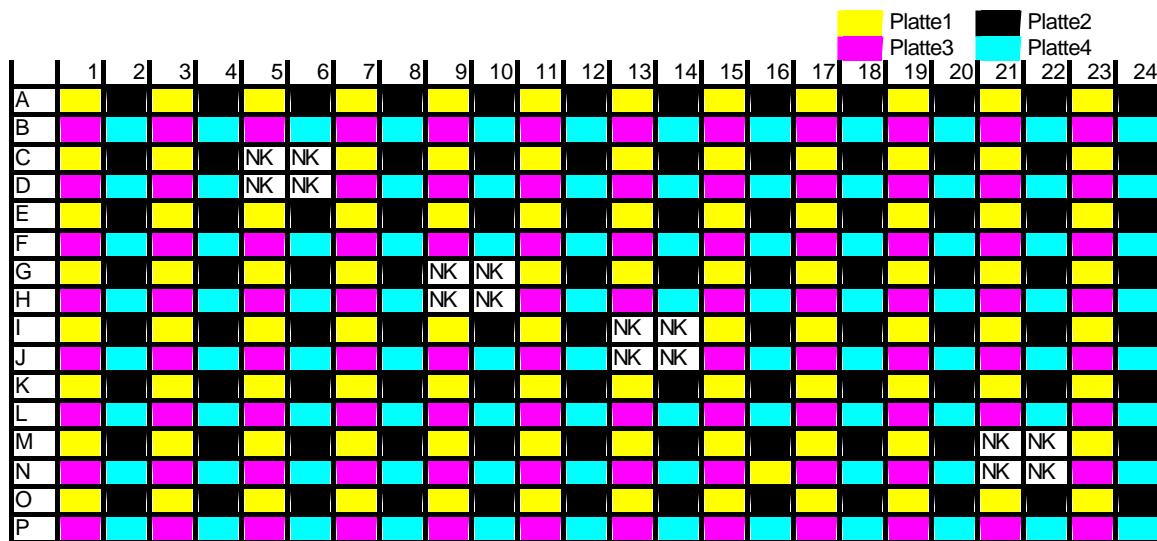
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B			NK									
C												
D					NK							
E							NK					
F												
G											NK	
H												

In einem anschließenden Verdünnungsschritt (1:20) wurden die einzelnen Proben unter Beachtung des oben genannten Kontrollschemas mit einem DNA-Gehalt von 1 ng/μl auf 96-er Clusterplates (Mutterplatten) überführt. Vier solcher Mutterplatten wurden zu einer 384-er Platte (Tochterplatte) nach einem vorgegebenen Schema (siehe Abb.) zusammengefasst.

Dabei wurden je 5 µl DNA (1ng/µl) von der Mutterplatte auf die Tochterplatte mit Hilfe der Pipettierstation Genesis RSP 150 Workstation überführt und bei Raumluft über Nacht getrocknet. Nach der Trocknung betrug die Gesamtkonzentration je Probe 5 ng.

Die Einhaltung eines Pipettierschemas sollte die richtige Probenplatzierung auf der 384-Platte sichern. In Abbildung 12 fällt bei sorgfältigem Probenauftragen die jeweils quadratische Anordnung der Negativkontrollen (NK) auf.

**Abbildung 12: Verteilungsmuster von vier Mutterplatten (96er Platten) auf eine Tochterplatte (384er Platte); NK=Negativkontrolle**



Die so hergestellten Tochterplatten wurden in den weiteren Arbeitsschritten im Rahmen der Genotypisierung mittels MALDI-TOF verwendet.

## 2.3.11.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) im Rahmen der hME-Methode für die MALDI-TOF

Vor der Primer-Extensions-Reaktion wird der genomische Bereich um den zu untersuchenden SNP mittels Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Die für diese Amplifikation verwendeten „Sense“- und „Antisense“-Primer weisen neben dem sequenzspezifischen Bereich jeweils ein zusätzliches Motiv von zehn Basen auf. Das zusätzliche Sequenzmotiv, der sogenannte „Tag“, erfüllt in diesem Zusammenhang mehrere Aufgaben. Zum einen verläuft die Amplifikationsreaktion gleichmäßiger, wenn mehrere PCR-Reaktionen in einem Reaktionsgefäß stattfinden (Multiplex), zum anderen ist es notwendig, die Masse dieser Primer mit Hilfe des „Tags“ soweit zu erhöhen, dass sie bei der anschließenden MALDI-TOF Analyse nicht im Massenbereich der Primer-Extensionsprodukte liegen und somit außerhalb

## MATERIAL UND METHODEN

des eingestellten Massenfensters sind, da bei der hME-Methode die überschüssigen, in der PCR unverbrauchten Primer nicht entfernt werden.

Die PCR-Reaktionen, die innerhalb der hME-Methode durchgeführt wurden, erfolgten in einem Reaktionsvolumen von 6 µl in einer 384er Mikrotiterplatte, in der sich die vorgelegte, über Nacht getrocknete DNA befand (5 ng). Dazu wurde mit Hilfe der Pipettierstation Genesis RSP 150 Workstation folgender, vorher angesetzter Mastermix auf die einzelnen Positionen der Platten verteilt:

**Tabelle 10: PCR für die hME-Methode in Platten mit 384 Positionen (Gesamtvolumen 6 µl)**

Komponenten	Volumen	Konzentration der Stammlösung
<i>10x Puffer</i>	0,6 µl	10x
<i>dNTP-Mix</i>	0,6 µl	(je 2 mM)
<i>Primer sense</i>	0,1 µl	100 µM
<i>Primer antisense</i>	0,1 µl	100 µM
<i>HotStarTaq</i>	0,02 µl	5 U/µl
<i>MgCl<sub>2</sub></i>	0,24 µl	25 mM
<i>H<sub>2</sub>O</i>	Ad 6 µl	

Die verwendeten Sense- und Antisense-Primer können Tabelle 11 entnommen werden.

**Tabelle 11: Verwendete Sense-, Antisense- und hME-Primer für (1) MDL-Population, (2) MD-Population und (3) D-Population**

SNP	Sense-Primer	Antisense-Primer	hME-Primer(Extension)
G-853T	(1)AOGTTGGATGCAAAGTGCTGGGATTACAGG	(1)AOGTTGGATGCCCCAAOCTGCCAAATTATC	(1)TACAGGOGTGAGCCACC
C7453T	(1)AOGTTGGATGGCAAATCAGAAAAGGAAGAG	(1)AOGTTGGATGCTTTTGCAAATCCTCCCTC	(1)TCCCTTCAACTACAACA
	(2)AOGTTGGATGGCAAATCAGAAAAGGAAGAG	(2)AOGTTGGATGCTTTTGCAAATCCTCCCTC	(2)GCCCTCCCTCAACTACAACA
C7624T	(1)AOGTTGGATGCATGTGACTGAGGAAAATGG	(1)AOGTTGGATGGTGGAACTGAGTTTCTTT	(1)GCTAGAGGGAAAGAGAC
T12777G	(1)AOGTTGGATGGCACATGGTTAGTGAAATGG	(1)AOGTTGGATGAGAACTATAATCCTCTAACC	(1)GTGAAATGGATTTTAAAGTGG
	(3)AOGTTGGATGGCACATGGTTAGTGAAATGG	(3)AOGTTGGATGAGAACTATAATCCTCTAACC	(3)TGAAACACTAAACAAACAAAAA
T18012G	(1)AOGTTGGATGTGTCTGAAGTGTTCATAGGG	(1)AOGTTGGATGGCAACTGTTGGTGTGGTATC	(1)GGATTGCTCAGTAATTAATTTTT
T21391A	(1)AOGTTGGATGAATGCACAGGAGCTTGGTAG	(1)AOGTTGGATGCTAAGAGGTTATAACAGCAG	(1)GAGCTCCTTTGGCATG
	(3)AOGTTGGATGAATGCACAGGAGCTTGGTAG	(3)AOGTTGGATGCTAAGAGGTTATAACAGCAG	(3)AGGTTATAACAGCAGACTGGTAAA

Die Proben-Amplifikation wurde für sämtliche Primer auf einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

**Tabelle 12: Temperaturbedingungen für die PCR**

<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>
95 °C	15 min (1 Zyklus)
95°C	20 sec
56 °C	30 sec (45 Zyklen)
72 °C	1 min
72 °C	3 min (1 Zyklus)
4 °C	unendlich

Nach erfolgter PCR wurde von einer Reihe (24 Proben) der 384-er-Platte je ein µl PCR-Produkt gemischt mit je 4 µl Ladepuffer auf ein 3%iges Agarose-Gel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese das Ergebnis der Amplifizierung überprüft. Es wurde eine Reihe der Platte ausgewählt, die Negativkontrollen enthielt, um mögliche Kontaminationen frühzeitig zu identifizieren.

#### **2.3.11.4 SAP-Reaktion**

Nach erfolgter PCR wurden freie, nicht in das Amplifikat eingebaute Desoxynukleotide durch das Enzym SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) abgebaut. Ein derartiges Vorgehen ist notwendig, da durch die freien Nukleotide andere als die vorher bestimmten Primer-Extensionsprodukte entstünden, wodurch Probleme bei der korrekten SNP-Detektion auftreten würden.

Mit Hilfe des Pipettierroboters Multimek 96 Automated 96-Channel Pipettor wurden 2 µl SAP-Mastermix bestehend aus SAP, hME-Puffer und H<sub>2</sub>O pro Well verteilt. Der SAP-Reaktion Mastermix für das benötigte Volumen einer 384er-Platte (1152,0µl im Überschuss für Pipettierroboter) wurde nach folgendem Protokoll hergestellt:

**Tabelle 13: SAP-Reaktion-Mastermix für ein Gesamtvolumen von 1152,0 µl**

Komponenten	Volumen
$H_2O$	881,3 µl
<i>hME-Puffer</i>	97,9 µl
<i>SAP (Shrimp alkaline phosphatase)</i>	172,8 µl

Für das anschließende Thermocycling zur Enzymaktivierung wurde folgendes Programm verwendet:

**Tabelle 14: Temperaturbedingungen für die SAP-Reaktion**

Temperatur	Zeit
37°C	20 min
85°C	10 min
20°C	1 sec

### 2.3.11.5 Primer-Extension-Reaktion

Mit Hilfe der Primer-Extension-Methode entstehen SNP-spezifische Primer-Extensionsprodukte, die sich aufgrund ihres unterschiedlichen Gewichts massenspektrometrisch unterscheiden lassen. Die eingesetzten Primer werden so konzipiert, dass entweder das 3'-oder das 5'-Ende des Primers (je nachdem ob es sich um Sense-oder Antisense-Primer handelt) eine Base vor dem SNP liegt. Die Verwendung von ddNTPs führt je nach Vorliegen des entsprechenden Allels zum Kettenabbruch und somit auch zu unterschiedlich großen Extensionsprodukten, die sich in der MALDI-TOF analysieren lassen. Neben dem sequenzspezifischen Bereich weisen die eingesetzten Primer jeweils ein zusätzliches Motiv von einigen Basen auf, den sogenannte „Tag“. Dieser „Tag“ ist notwendig, wenn mehrere Reaktionen gleichzeitig in einem Ansatz laufen (Multiplex-Methode), um aufgrund der unterschiedlichen Massen in der MALDI-TOF-Analyse zwischen den einzelnen Extensionsprodukten unterscheiden zu können.

2µl eines nach folgendem Protokoll angefertigtem Mastermixes wurden jeder Probe zugesetzt:

**Tabelle 15: PCR der Primer-Extension-Reaktion**

Komponenten	Volumen
<i>Stopplösung (hME Extend Mix, enthaltend Puffer und dNTPs/ddNTP)</i>	0,2 µl
<i>hME-Primer</i>	0,054 µl
<i>MassExtend Enzym (Thermosequenase)</i>	0,018 µl
<i>H<sub>2</sub>O</i>	Ad 2 µl

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten hME-Primer können Tabelle 11 entnommen werden.

Alle erforderlichen Pipettierschritte erfolgten dabei auf der Pipettierstation Multimek96 Automated 96 Channelpipettor unter Verwendung von programmierten Standardabläufen. Das für die Primer-Extensionsreaktion erforderliche Thermocycling wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

**Tabelle 16: Temperaturbedingungen für Primer-Extension-Reaktion**

<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>
<i>94 °C</i>	2 min
<i>94°C</i>	5 sec
<i>52 °C</i>	5 sec (55 Zyklen insgesamt)
<i>72 °C</i>	10 sec
<i>20 °C</i>	1 sec

### 2.3.11.6 Aufreinigung der Extensionsprodukte

In einem letzten Schritt wurden die Extensionsprodukte mittels eines Kationenaustauschharzes (Spectroclean) aufgereinigt, bevor sie massenspektrometrisch analysiert werden konnten. Dieser Arbeitsschritt ist notwendig, um z.B. letzte Pufferbestandteile oder  $Mg^{2+}$  zu entfernen, die die anschließende Detektion negativ beeinflussen können. Nach einem Standardprotokoll wurden zusätzlich zum Spectroclean noch 16  $\mu$ l  $H_2O$  pro Well mit Hilfe des Pipettierroboters Multimek96 Automated 96 Channelpipettor pipettiert. Zentrifugation und Rotation wurden abschließend durchgeführt.

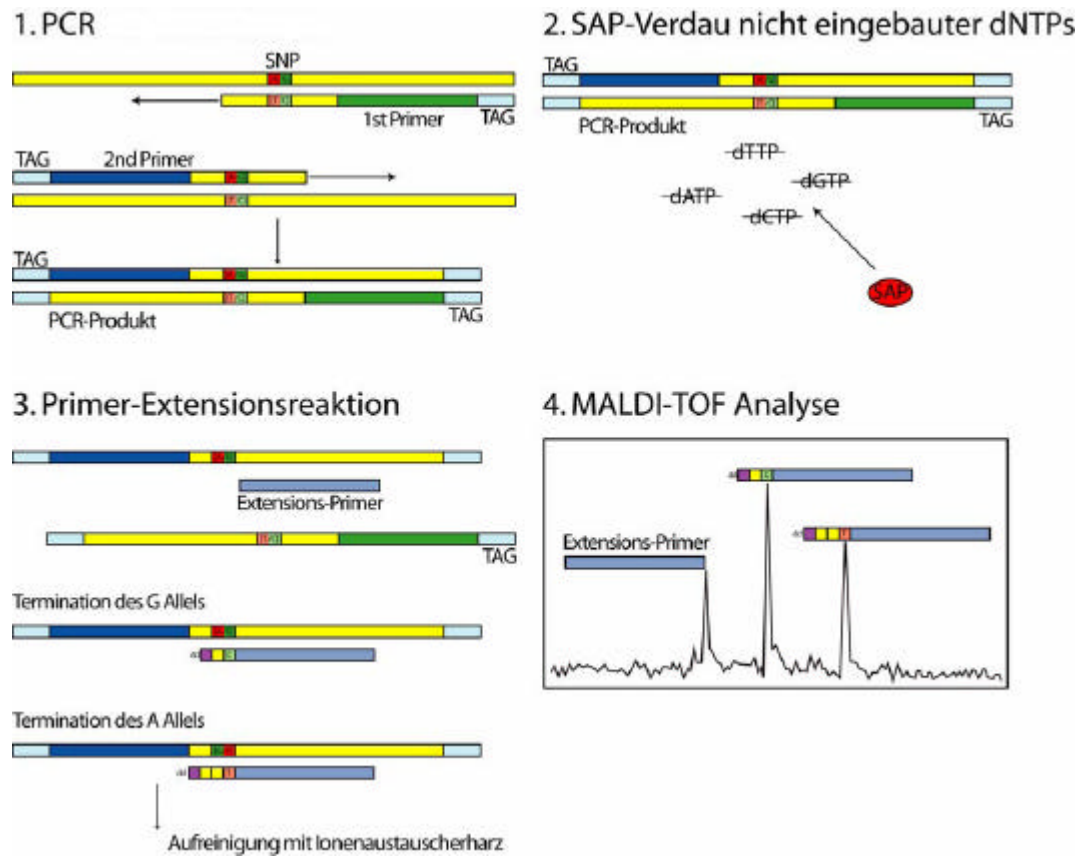
### 2.3.11.7 MALDI-TOF-Massenspektrometrie im Rahmen der hME-Methode

Nach erfolgter Probenaufbereitung wurden 1-2 nl des Analysengemisches mit Hilfe des Spectro Point Nanoliter Pipetting Systems™ auf einen Siliziumchip transferiert. Hierbei handelt es sich um einen 384er Siliziumchip, der mit einer kristallinen Matrix (3-Hydroxypicolinsäure) beladen ist. Zusätzlich zu diesen 384 Matrixspots, auf welche die zu analysierenden Proben übertragen wurden, befinden sich 10 weitere Matrixspots auf dem Chip, die mit einem Kalibranten beschickt wurden. Der verwendete Kalibrant besteht aus einer Mischung von Oligonukleotiden bekannter Masse und diente der Kalibrierung des Analysesystems.

Nach Beladung des Chips wurde dieser auf einen metallischen Probenträger übertragen und in die Vakuumschleuse des Biflex II Massenspektrometers eingeführt. Die Vermessung und Analyse der Proben sowie Kalibrierung des Systems erfolgten automatisch nach Standardeinstellungen.



**Abbildung 13: Schematischer Ablauf der hME-Methode (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. H. Gohlke, GSF, München)**



## 2.3.12 Statistik

### 2.3.12.1 Bilden von Haplotypblöcken

Zur Eingrenzung der SNPs, die tatsächlich typisiert werden mussten, um die Abdeckung aller Genotypen für einen maximalen Informationsgehalt zu erreichen, wurde eine Haplotypblockanalyse vorgenommen.

Dabei gibt es verschiedene Ansätze. Eine Variante, die hier benutzt wird, ist es, SNPs, zwischen denen ein hoher Zusammenhang besteht, in Blöcke zusammenzufassen und lediglich jeweils einen SNP pro Block für die Genotypisierung auszuwählen. Diese ausgewählten SNPs werden als „tagging SNPs“ bezeichnet. Als Maß für den allelischen Zusammenhang wird hierbei das Linkage Disequilibrium (=LD) benutzt. Hohes LD zwischen zwei SNPs bedeutet einen hohen Zusammenhang zwischen diesen SNPs, weshalb LD häufig auch als „allelic association“ bezeichnet wird.

Mit Hilfe des Programms Haploview wurde in der vorliegenden Arbeit die Analyse des Kopplungsungleichgewichtes durchgeführt (BARRETT 2005) (siehe auch 3.1.3).

### 2.3.12.2 Hardy - Weinberg

Genotypfrequenzen werden durch Vererbungsmuster bestimmt, wobei man im Allgemeinen von einer zufälligen Paarung ausgehen kann. Dabei befinden sich dominante und rezessive Merkmale in einer Population in einem Gleichgewicht. Anhand von statistischen Berechnungen wurde gezeigt (G.H. Hardy und W. Weinberg), dass die Allelhäufigkeiten und daraus resultierend auch die Genotypenhäufigkeiten unter konstanten äußeren Bedingungen von Generation zu Generation gleichmäßig vererbt werden. Dabei bildet Panmixie die äußeren Voraussetzungen, d.h., die Forderung nach zufälliger und uneingeschränkter Paarung der Partner in einer (unendlich großen) Population muss erfüllt sein. Die dann resultierenden Nachkommen müssen wiederum gleiche Überlebenschancen, die gleiche Fruchtbarkeit und gleiche Paarungschancen haben (HARTL und CLARK 1997).

Im Modell von Hardy-Weinberg gibt es eine mathematische Beziehung zwischen der Allelfrequenz und der Genotypfrequenz, die gegeben ist durch

$$AA = p^2, Aa = 2pq, aa = q^2,$$

wobei p und q die Allelfrequenzen von A und a,  $p^2$ ,  $2pq$  und  $q^2$  die Häufigkeit der jeweiligen Genotypen darstellen. Die Frequenzen der Gleichungen konstituieren das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (oder Hardy-Weinberg-Equilibrium=HWE). Ist das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht nicht erfüllt, so deutet dies auf eine Verletzung der Modellannahmen hin.

Als Test auf Abweichung vom HWE wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet, bei welchem die erwarteten Häufigkeiten aus den beobachteten Allelfrequenzen abgeleitet werden. Signifikante Abweichungen vom HWE deuten in der Praxis meist auf ein technisches Problem bei der Genotypisierung hin. Die Überprüfung des HWE wurde daher zur Überprüfung der Genotypisierungsqualität verwendet.

### 2.3.12.3 Assoziation

#### 2.3.12.3.1 Qualitative Phänotypen

Ob ein Zusammenhang zwischen den Genotypen der CLNS1A-SNPs mit bestimmten dichotomen Phänotypen besteht, wurde mit verschiedenen Chi-Quadrat-Tests sowie mittels Armitage-Trend-Tests geprüft. Dabei wurde einem Vorgehen von Sasiene gefolgt (SASIENE 1997), der verschiedene Modelle aufführt: zum einen das lineare Modell, das eine Zu- oder Abnahme einer Krankheitswahrscheinlichkeit mit wachsender Anzahl eines Allels annimmt, sowie das allelische Modell, bei welchem die Häufigkeiten der Allele zwischen Patienten und Gesunden verglichen werden. Das dominante Modell (dominant auf dem seltenen Allel), fasst

den heterozygoten mit dem homozygot polymorphen Genotyp zusammen und führt dann einen Vierfelder-Chiquadrattest durch. Zwei weitere Vierfelder- Chiquadrattests werden bei Sasieni angeführt: bei dem einen werden nur die Häufigkeiten vom Wildtyp und heterozygoten Genotyp berücksichtigt, und bei dem anderen die Häufigkeiten von Wildtyp und Polymorphismus.

Für die nachfolgenden Ergebnisse wird das jeweilige verwendete Modell stets explizit angeführt. Lediglich das lineare Modell verlangt den Armitage-Trend-Test. Die anderen Modelle verwenden den Chi-Quadrat-Test, um eine Assoziation zwischen Genotyp und Phänotyp zu berechnen. Als Effektmaß sämtlicher Tests wird die Odds Ratio (Risiko-Ratio, OR) angegeben. Sie stellt das Chancenverhältnis zwischen zwei Gruppen dar, eine Krankheit zu bekommen. Bei einer OR für Asthma von 2:1 für die Gruppen mit Mutation/ ohne Mutation bedeutet dies: Die Chance, an Asthma zu erkranken, ist in der Gruppe mit Mutation doppelt so hoch wie in der Gruppe ohne Mutation. Odds Ratios werden stets mit 95%igem Konfidenzintervall angegeben. (d.h. in 95% aller Ziehungen würde die wahre Odds Ratio innerhalb des Konfidenzintervalls liegen)

### 2.3.12.3.2 Quantitative Phänotypen

Des Weiteren wurde bestimmt, ob verschiedene Lungenfunktionsparameter in Abhängigkeit des Genotyps bestimmter Polymorphismen signifikante Unterschiede aufweisen.

Dazu wurden zunächst univariate Varianzanalysen durchgeführt mit der Nullhypothese, davon ausgehend, dass es keine Mittelwertunterschiede zwischen verschiedenen Gruppen gibt (d.h. hier keine Mittelwertunterschiede zwischen verschiedenen Genotypen).

Zusätzlich wurden die Mittelwertunterschiede in einem rezessiven Modell getestet, wobei der t-Test verwendet wurde. Das rezessive Modell betrachtet Wildtyp und heterozygoten Genotyp gemeinsam und vergleicht diese mit dem homozygot polymorphen Genotyp.

Sämtliche Tests wurden zweiseitig durchgeführt und als Signifikanzniveau wurde ein  $\alpha$  von 0,05 festgelegt. Die Assoziationsanalysen sowie die Tests auf Abweichungen vom HWE wurden mit SAS 9.1.3 oder SAS/ Genetics durchgeführt.

### 2.3.13 Phylogenetische Analysen (VISTA Browser)

Um abschätzen zu können, ob Polymorphismen in einer Genregion von möglicher funktioneller Relevanz liegen, wurden die evolutionäre Konservierung dieser Bereiche in der Evolution untersucht.

Mit Hilfe des Programms Vista Browser ist es möglich, solche phylogenetischen Analysen von genomischen Sequenzen durchzuführen. Dabei werden die genomischen Sequenzen unterschiedlicher Spezies miteinander verglichen und hochkonservierte Genregionen identifiziert. Damit sind Bereiche eines Gens gemeint, die sich während der Phylogenese erhalten haben und sich daher im Genom unterschiedlicher Spezies wiederfinden. Konservierte Bereiche sind oft von großer funktioneller Wichtigkeit.

Das Programm Vista Browser stellt die Ergebnisse seiner Analysen graphisch dar: die Kurven vermitteln die Höhe der Konservierung zwischen den verglichenen Sequenzen in Prozent. Zusätzlich sind hochkonservierte Regionen farblich markiert (siehe Abb. 20 unter 3.4.1).

Für den im CLNS1A-Gen identifizierten SNP C7624T, der signifikante Ergebnisse in der Lungenfunktionsanalyse zeigt (siehe 3.3.6.1), wurde eine phylogenetische Analyse mit dem Programm Vista Browser durchgeführt, wobei die humane Sequenz mit der des Hundes und der Maus verglichen wurde.

### 2.3.14 Analyse von Transkriptionsfaktorbindestellen (MAT-Inspector)

Das Auftreten von Polymorphismen kann unterschiedliche Auswirkungen auf das Gen und dessen Funktion haben: liegt ein SNP im Bereich eines Exons, so kann dies zu einer Veränderung der betroffenen Aminosäuresequenz führen. Eine veränderte Aminosäuresequenz kann mit einer Funktionsänderung des entsprechenden Proteins, für das das Gen kodiert, verbunden sein. Dabei kann der Basenaustausch einen kompletten Funktionsverlust des Proteins, aber auch eine reduzierte, erhöhte oder unveränderte Funktion des Proteins bedeuten. Ein Basenaustausch im Bereich eines Exons kann jedoch auch ohne Einfluss auf die Aminosäuresequenz sein. Man spricht dann von einer „stillen Mutation“. Liegt der Basenaustausch im Bereich eines Introns, so können regulatorische Elemente der Transkription betroffen sein, wodurch sich Bindungsmotive für DNA-bindende Proteine verändern können und damit die Transkriptionsrate eines Gens beeinflussen. DNA-bindende Proteine sind z.B. Transkriptionsfaktoren (TF), die für die Initiation der RNA-Polymerase bei der Transkription von Bedeutung sind. Grundsätzlich werden allgemeine (basale) und gewebe- bzw. zellspezifische Transkriptionsfaktoren unterschieden. Allgemeine

Transkriptionsfaktoren sind für jede Transkription notwendig und binden dabei entweder direkt an die DNA oder an andere Proteine eines Initiationskomplexes. Transkriptionsfaktoren sind in ihrer Struktur divers und haben unterschiedliche Aufgaben. Einige besitzen Bindestellen für wichtige Regulatoren, andere haben Proteinkinase-Funktionen oder zeigen Helicase-Aktivität. Sie sind ubiquitär, d.h. sie sind in allen Zellen eines Organismus gleichmäßig vorhanden und haben an der spezifischen Genregulation meist keinen Anteil. Dagegen vermitteln spezifische Transkriptionsfaktoren der Polymerase welches Gen aktiviert werden soll. Sie sind daher nur in den Zellen vorhanden, in denen das Gen, welches sie regulieren, aktiviert bzw. reprimiert werden soll. Die DNA-Bereiche, an die sie binden, haben eine spezifische Sequenz (cis-Element oder Enhancer), die von dem Transkriptionsfaktor erkannt wird. Spezifische Transkriptionsfaktoren werden meist durch Proteinkinasen aktiviert. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe des Programms MAT-Inspector der sequenzierte Promotorbereich sowie Teile von Intron 1 des CLNS1A-Gens auf mögliche Transkriptionsfaktor-Bindestellen analysiert, um mögliche funktionelle Auswirkungen der im CLNS1A-Gen identifizierten SNPs zu untersuchen. Bei MAT-Inspector handelt es sich um ein Programm zur Transkriptionsfaktor-Analyse, welches Transkriptionsfaktorbindestellen in Sequenzen unlimitierter Länge findet und auf ein mögliches Bindungspotential schließt, jedoch nichts über die Funktionalität der gefundenen Bindestelle aussagt. Zur Beschreibung, wie gut die in der eingegebenen Sequenz gefundenen Bindestelle mit der tatsächlichen Bindesequenz aus der Datenbibliothek des Programms übereinstimmt, verwendet MAT-Inspector die Begriffe *core sequence*, *core similarity* und *matrix similarity*, wobei die *core sequence* als Sequenz aufeinanderfolgender Positionen der Matrix definiert ist, die am höchsten konserviert sind (gewöhnlich vier). Das Maximum der *core similarity* von 1,0 wird nur erreicht, wenn die am höchsten konservierten Basen der Matrix exakt mit der untersuchten Sequenz übereinstimmen. Wichtiger noch als die *core similarity* ist die *matrix similarity*, welche die Übereinstimmung aller Basen der Matrize, nicht nur der *core sequence*, mit der untersuchten Sequenz prüft. Eine perfekte Übereinstimmung, bei der alle Sequenzpositionen der Matrix entsprechen, erhält eine *matrix similarity* von 1,0. Im Fall einer „guten“ Übereinstimmung beträgt die *matrix similarity*  $> 0,8$ .

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Ergebnisse des Mutationsscreenings

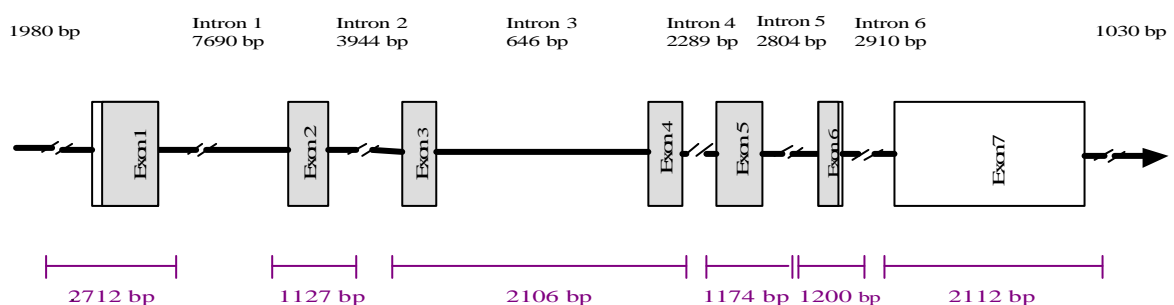
##### 3.1.1 Amplifikation und Sequenzierung

In einem ersten Schritt wurde untersucht, ob und welche Genveränderungen im CLNS1A-Gen bei einer Population deutschen Ursprungs vorliegen. Dafür wurden im Rahmen dieses Mutationsscreenings 10432 bp des CLNS1A-Gens bei 37 Probanden einer Zufallsstichprobe (siehe 2.1.1) untersucht. In dieser Sequenz waren 2000 bp des proximalen Promotors, alle sieben Exons einschließlich je 500 bp der flankierende Intronregion und 1000 bp der proximalen 3'-UTR enthalten (siehe Abb. 14). Mit Hilfe von 27 zum teil überlappenden Fragmenten konnten diese genomischen Bereiche abgedeckt werden (siehe 15). Die hierfür in der PCR eingesetzten Primerpaare sowie die entsprechenden Fragmente können Tabelle 7 unter 2.3.9 entnommen werden.

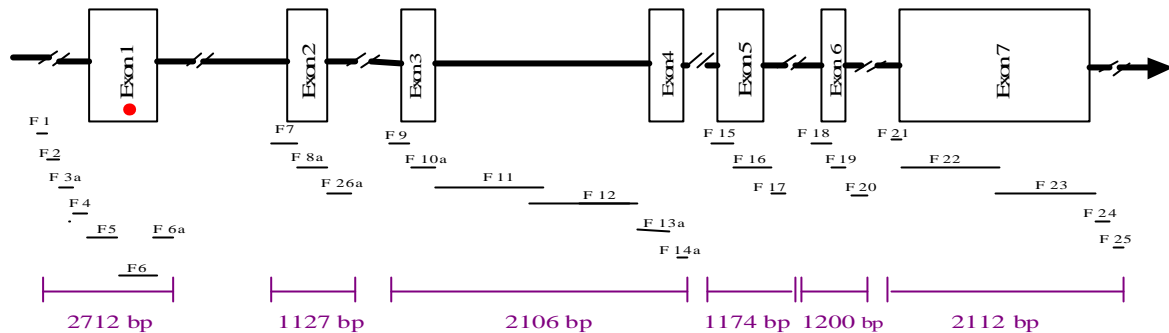
24 der insgesamt 27 Fragmente konnten mit der unter 2.3.3 beschriebenen Methode der PCR amplifiziert und später aufgereinigt werden. Lediglich für die Fragmente 1, 3a und 16 wurden für ein optimales PCR-Produkt nested-PCR und Gelextraktion angewendet (siehe 2.3.4 und 2.3.7).

Nach erfolgter Amplifikation mittels PCR und Aufreinigung wurden die einzelnen DNA-Fragmente für das eigentliche Mutationsscreening sequenziert. Abhängig von der Struktur der Sequenzierungsfragmente (z.B. Auftreten von heterozygoten Deletionen bzw. Insertionen) wurden die Fragmente vom 3'- oder 5'- Ende an sequenziert. Die Leserichtung der einzelnen Proben kann Tab. 8 in Abschnitt 2.3.9 entnommen werden.

**Abbildung 14: Schematische Darstellung des CLNS1A-Gens mit Intron- und Exonbereichen; die zusammenhängenden sequenzierten Bereiche sind lila markiert; Durchbrechungsstriche kennzeichnen nicht dargestellte Intronbereiche; kodierende Genbereiche sind grau hinterlegt.**



**Abbildung 15: Fragmentkarte für die sequenzierten Bereiche im CLNS1A-Gen: schematisch dargestellt sind die zum Teil sich überlappenden Fragmente (F) 1 bis 26a.**

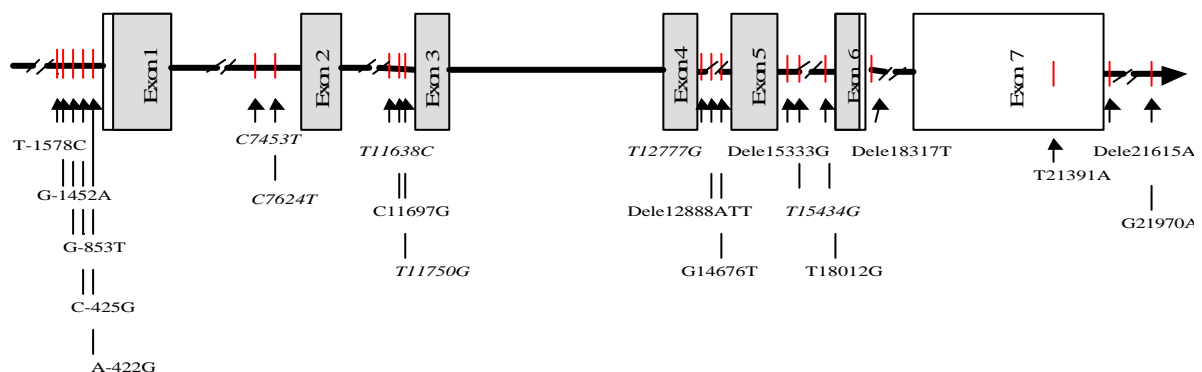


### 3.1.2 Identifizierung von Mutationen und Polymorphismen im CLNS1A-Gen

1183 Sequenzen der 27 Fragmente von insgesamt 37 Probanden einer Zufallsstichprobe standen nach erfolgreicher Sequenzierung zur Auswertung bereit. Die Auswertung fand durch direkten Vergleich der zu untersuchenden Sequenz mit einer Referenzsequenz (NT\_033927, Gene ID 1207) aus der genomischen Datenbank des National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) statt. Lediglich Sequenzen mit eindeutigen Signalen wurden für die Auswertung berücksichtigt.

Insgesamt konnten 20 neue SNPs in hier untersuchten Bereichen des CLNS1A-Gens identifiziert werden (siehe Gen-Graphik Abb.16).

**Abbildung 16: Schematische Darstellung des CLNS1A-Gens mit identifizierten SNPs; bereits beschriebene SNPs sind kursiv dargestellt; kodierende Genbereiche sind grau hinterlegt.**



Sechs Polymorphismen wurden parallel zu den hier durchgeführten Untersuchungen von anderen Forschungsgruppen beschrieben und sind bereits in Datenbanken veröffentlicht worden (siehe [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). Es handelt sich dabei zum einen um zwei in mehreren Populationen nachgewiesene SNPs (rs2013296, rs3781616; <http://snpper.chip.org/>) und zum anderen um vier zwar beschriebene Variationen (rs7109527, rs11237249, rs7131298, rs7131169), über deren Häufigkeitsverteilung bisher keinerlei Daten vorliegen und deren Existenz somit als nicht gesichert angesehen werden konnte.

Neu identifiziert wurden in den hier durchgeführten Untersuchungen fünf SNPs in der 5'-UTR und ein SNP im sequenzierten Bereich von Intron 2. Ebenso konnte der Nachweis der vier beschriebenen, jedoch nicht gesicherten SNPs in den bearbeiteten Abschnitten von Intron 1 und 2 erbracht werden. Der hier untersuchte Bereich des vierten Introns enthielt neben der bereits veröffentlichten und gesicherten Variation einen neu identifizierten SNP und eine 3-Basen-Deletion (ATT-). Ähnlich verhält es sich im bearbeiteten Teil von Intron 5, wo die Existenz einer bereits veröffentlichten und gesicherten Variation bestätigt und ein weiterer SNP sowie eine 1-Basen-Deletion entdeckt werden konnte. Ebenfalls neu identifiziert wurde im untersuchten Teil von Intron 6 eine 1-Basen-Deletion. Das siebte Exon, welches transkribiert, jedoch nicht translatiert wird, wies den einzigen SNP in einem Exon auf. Ein SNP und eine 1-Basen-Deletion 3' von Exon 7 im sequenzierten Teil der 3'-UTR wurden ebenfalls in dieser Arbeit neu identifiziert.

Neben den hier identifizierten SNPs sind drei weitere bereits bekannte und gesicherte SNPs (rs7946637, rs4945191, rs1783667) im CLNS1A-Gen beschrieben, die jedoch in von uns nicht-sequenzierten Intronbereichen des Gens liegen. Zwei dieser Mutationen sind mit von uns untersuchten SNPs gekoppelt. Kopplungsanalysen zeigen, dass sowohl rs7946637 mit dem von uns untersuchten SNP rs2013296 (T12777G) als auch rs4945191 mit rs3781616 (T15434G) gekoppelt sind ( $r^2 > 0,8$ ). Lediglich rs1783667 zeigt kein Kopplungsverhalten zu den in dieser Arbeit untersuchten SNPs ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)).

Die Verteilung der neu entdeckten und bereits veröffentlichten SNPs innerhalb der Mutationsscreening-Population sowie eine graphische Darstellung der SNP-Verteilung in den untersuchten Genbereichen kann der folgenden Kopplungskarte (Linkage-Map, Abb.17) bzw. Abb.16 entnommen werden:



### Abbildung 17: Kopplungskarte (Linkage Map)

Insgesamt 19 der 20 neu identifizierten Mutationen weisen eine Minor Allel Frequency (MAF) >3% auf. Tritt eine Mutation mit einer Häufigkeit >3% auf, spricht man von einem Polymorphismus. Anderenfalls handelt es sich um eine seltene genetische Variante.

Im nächsten Schritt sollten nun SNPs für die Durchführung einer Assoziationsstudie ausgewählt werden. Da jedoch gekoppelte SNPs keine zusätzliche Information liefern, wurde nach „SNP-Clustern“ von gekoppelten SNPs gesucht, um die Genotypinformation aller identifizierten SNPs zu erhalten, jedoch nicht mehr SNPs als notwendig zu genotypisieren.

Bei der Betrachtung der erstellten Kopplungskarte (siehe Abb. 17) fällt bereits ein gewisses Kopplungsverhalten zwischen einzelnen SNPs auf. Damit ist gemeint, dass einige Polymorphismen immer gemeinsam auftreten. So kann man bei gekoppelten SNPs mit der Kenntnis des einen Genotyps indirekt auf den Genotyp des gekoppelten SNPs schließen. Auf diese Weise lässt sich die Anzahl der zu genotypisierenden SNPs reduzieren. Um sich dieses Phänomen zu Nutze zu machen, wurde das Kopplungsverhalten der im CLNS1A-Gen identifizierten SNPs mit Hilfe des Programms Haploview untersucht.

### 3.1.3 Analyse des Kopplungsungleichgewichtes (Linkage Disequilibrium, LD)

Das Programm Haploview untersucht Zusammenhänge zwischen SNPs, die meist durch Kopplung bedingt sind. Dabei identifiziert Haploview Gruppen von SNPs, die einen mehr oder weniger starken Zusammenhang zueinander haben. Der „Repräsentant“ einer solchen Gruppe wird als *tagging snp* bezeichnet, der mit den anderen SNPs der Gruppe stark gekoppelt ist. Als Maß für den Zusammenhang zwischen den SNPs dient das Linkage Disequilibrium (LD), welches zwischen 0 und 1,0 liegt.

In der vorliegenden Arbeit ergab die Haploview-Analyse, dass 12 der identifizierten SNPs im CLNS1A-Gen eine LD von 1,0 aufweisen, also in allen untersuchten Individuen immer gemeinsam auftraten. Als *tagging snp* wurde C7453T ausgewählt, der mit C-425G, A-422G, T11638C, C11697G, T11750G, Dele12888ATT, G14676T, Dele15333G, T15434G, Dele18317T und Dele21615A zu 100% gekoppelt ist. Da der SNP G-1452A ein LD>0,66 zu diesem Cluster zeigt, erhielt man durch die Genotypisierung des *tagging snps* C7453T die notwendigen Genotypinformationen. Die sieben weiteren identifizierten SNPs im CLNS1A-Gen (T-1578C, G-853T, C7624T, T12777G, T18012G, T21391A und G21970A) zeigen keinen nennenswerten Zusammenhang untereinander, so dass hier von keiner Kopplung ausgegangen werden kann.

Die Ergebnisse der Haploview-Analyse sind graphisch in Abb. 18 dargestellt. Die unterschiedliche Schattierung der Felder markiert das Maß des Zusammenhangs (LD), wobei die Farbe Schwarz für einen starken Zusammenhang steht (LD = 1,0) und Weiß einen fehlenden Zusammenhang markiert (LD = 0). Siehe dazu auch die Legende zu Abb. 18.

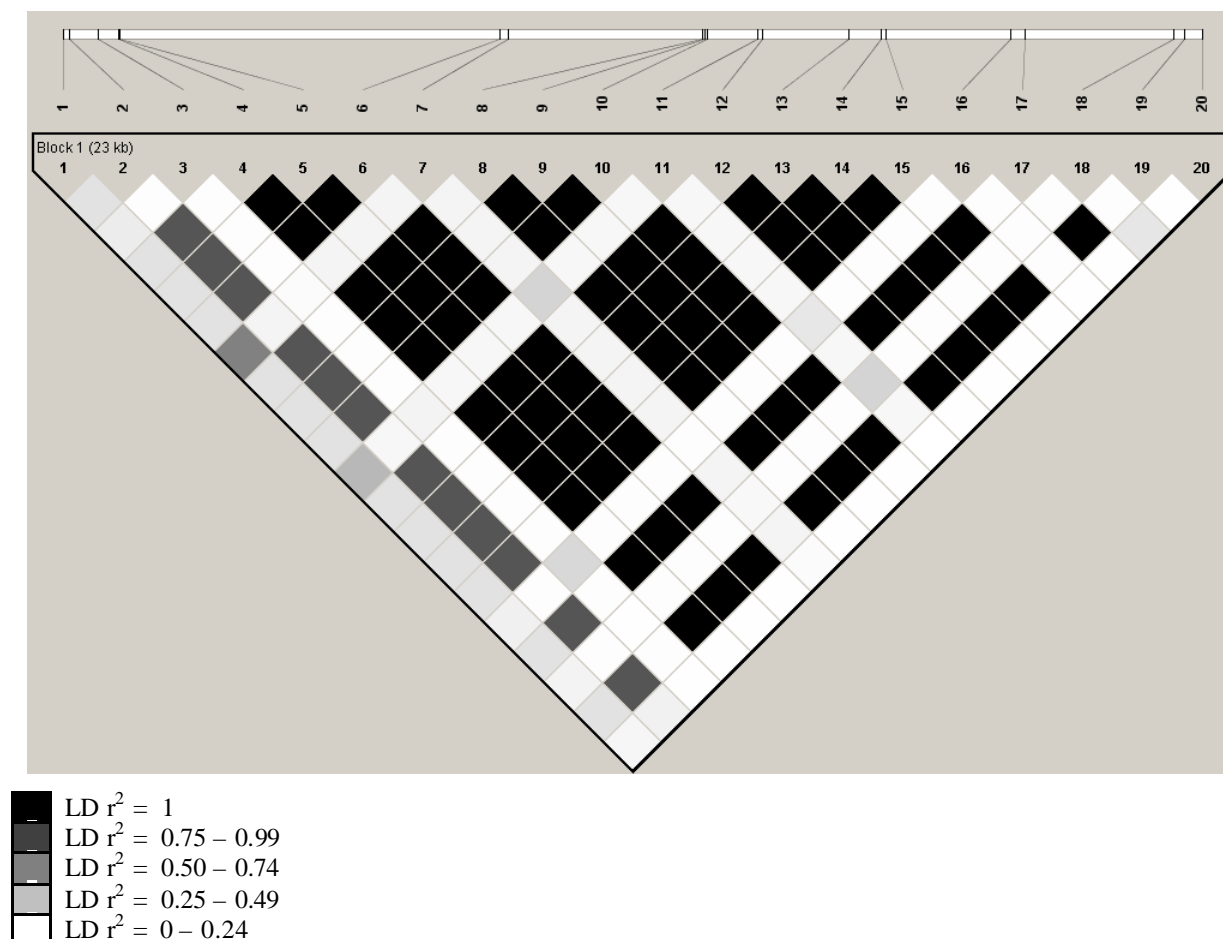
## ERGEBNISSE

Auf Grund der vorliegenden Analyse wurden insgesamt sieben Polymorphismen im CLNS1A-Gen zur Genotypisierung ausgewählt: C7453T als *tagging SNP* sowie T-1578C, G-853T, C7624T, T12777G, T18012G und T21391A, welche scheinbar kein Kopplungsverhalten aufweisen. G21970A wurde auf Grund einer zu geringen Allelfrequenz von < 3% von der Genotypisierung ausgeschlossen.

**Abbildung 18: Graphische Darstellung des Linkage Disequilibrium;**

In Graustufen dargestellt ist der Grad der Kopplung zwischen den nachfolgend aufgeführten SNPs 1 – 20. Es wird ersichtlich, dass z. B. der tagging SNP C7453T (hier SNP 6) zu 100% mit den SNPs 4,5,8,9,10,12,13,14,15,17 und 19 gekoppelt ist:

1=T-1578C, 2=G-1452A, 3=G-853T, 4=C-425G, 5=A-422G, 6=C7453T, 7=C7624T, 8=T11638C, 9=C11697G, 10=T11750G, 11=T12777G, 12=Dele12888ATT, 13=G14676T, 14=Dele15333G, 15=T15434G, 16=T18012G, 17=Dele18317T, 18=T21391A, 19=Dele21615A, 20=G21970A

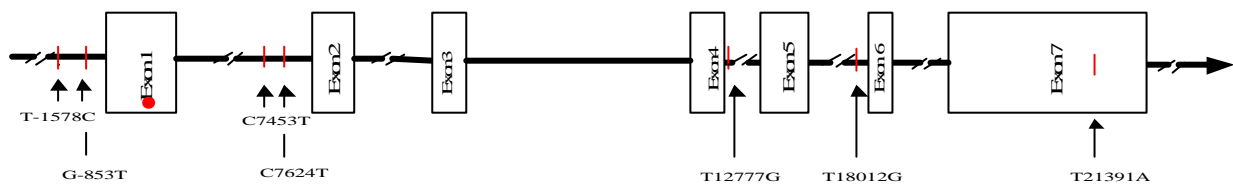


## 3.2 Ergebnisse der Genotypisierung

### 3.2.1 Technische Durchführung der Genotypisierung

Von den ursprünglich 7 zur Genotypisierung ausgewählten SNPs im CLNS1A-Gen konnten lediglich 6 erfolgreich mit Hilfe der Methode der MALDI-TOF genotypisiert werden. Für die im Promotor neu identifizierte Variation T-1578C war es auch nach mehrmaligen Versuchen nicht möglich, spezifische Primer zur Genotypisierung zu finden. Eine Untersuchung mittels MALDI-TOF war daher nicht durchzuführen. Der ebenfalls im Promotor lokalisierte SNP G-853T, der viermal bei 37 Probanden der Mutationsscreeningspopulation nachgewiesen wurde, zeigte sich bei der Typisierung in der Fall-Kontroll-Population nur noch niederfrequent (Nachweis des seltenen Allels lediglich neun mal in 1870 Probanden (MAF 0,003)). Es muss in diesem Fall von einer sehr seltenen Mutation ausgegangen werden, die zufällig höherfrequent in der Screeningpopulation aufgetreten ist. Auf Grund der Seltenheit wurde G-853T in der vorliegenden Arbeit nicht weiter analysiert.

**Abbildung 19:** Schematische Darstellung des CLNS1A-Gens mit den zur Genotypisierung ausgewählten SNPs.



Welcher SNP in welcher Population genotypisiert wurden, kann Tabelle 17 entnommen werden:

**Tabelle 17:** Übersicht über genotypisierte SNPs und die jeweils verwendete Population

	Fall-Kontroll-Population	Querschnitt	Querschnitt
	MDL	Dresden	München
SNP	N=1872	N=1940	N=1159
G-853T	X		
C7453T	X	X	X
C7624T	X		
T12777G	X	X	
T18012G	X		
T21391A	X	X	

## ERGEBNISSE

Insgesamt konnten 88% - 98% der Probanden der Fall-Kontroll-Population MDL (siehe 2.1.2) erfolgreich für alle 6 SNPs genotypisiert werden. Für C7453T lagen zusätzlich die Genotypen von 97% der Querschnittspopulation München-Dresden (MD) vor und für die beiden SNPs T12777G und T21391A wurden bei 99,0% der Dresdner Querschnittspopulation (D) erfolgreich genotypisiert. Allel-Frequenzen für die bereits bekannten und gesicherten SNPs T15434G (rs3781616) und T12777G (rs2013296) waren vergleichbar mit bereits veröffentlichten Frequenzen. Siehe dazu Tabelle 18.

**Tabelle 18: Übersicht der identifizierten SNPs im CLNS1A-Gen: Lokalisation und Minor Allel-Frequenzen (MAF)**

snp*	Lokalisation	Screenings- population	Minor Allel-Frequenzen (MAF) in		Publikationen (europäische Population)
			Querschnitts- population	Kontroll-Population (von MDL)	
<b>T-1578C</b>	<b>5'-UTR</b>	0,450			
G-1452A	5'-UTR	0,080		#	
<b>G-853T</b>	<b>5'-UTR</b>	<b>0,055</b>		<b>0,003</b>	
C-425G	5'-UTR	0,080		#	
A-422G	5'-UTR	0,080		#	
<b>C7453T</b>	<b>Intron 1</b>	<b>0,080</b>	<b>0,099 (D)</b>	<b>0,092</b>	<b>0,108</b>
rs 7109527			<b>0,096 (MD)</b>		
<b>C7624T</b>	<b>Intron 1</b>	<b>0,325</b>		<b>0,228</b>	
rs11237249					
T11638C	Intron 2	0,080		#	
rs7131298					
C11697G	Intron 2	0,080		#	
T11750G	Intron 2	0,080		#	
rs7131169					
<b>T12777G</b>	<b>Intron 4</b>	<b>0,255</b>	<b>0,293 (D)</b>	<b>0,271</b>	<b>0,233</b>
rs2013296					
Dele12888ATT	Intron 4	0,080		#	
G14676T	Intron 4	0,080		#	
Dele15333G	Intron 5	0,080		#	
T15434G	Intron 5	0,080		#	
rs3781616					
<b>T18012G</b>	<b>Intron 5</b>	<b>0,070</b>		<b>0,077</b>	
Dele18317T	Intron 6	0,080		#	
<b>T21391A</b>	<b>Exon 7</b>	<b>0,050</b>	<b>0,062 (D)</b>	<b>0,057</b>	
Dele21615A	3'-UTR	0,080		#	
G21970A	3'-UTR	0,025			
* Nukleotid-Nummerierung beginnt mit dem ersten Nukleotid von CLNS1A ORF					
Fett gedruckt sind sämtliche zur Genotypisierung ausgewählten SNPs					
rs-Nummer falls vorhanden angeben					
# Kopplungsungleichgewicht mit C7453T					
D=Dresden					
MD=München+Dresden					

### 3.2.2 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht als Qualitätskontrolle

Die Genotypisierung wurde mit Hilfe des Hochdurchsatzverfahrens MALDI-TOF durchgeführt. Bei den Genotypisierungen zeigte sich, dass alle Allel-Frequenzen in der Fall-Kontroll-Population MDL sowie in der Dresdner Querschnittspopulation im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht waren (siehe Tabelle 19). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Genotypisierung mittels MALDI-TOF keine technischen bzw. methodischen Fehler aufwies.

**Tabelle 19: Test auf Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE)**

SNP/Genotypen	MDL		Dresden	
	N (%)	HWE p-Wert	N (%)	HWE p-Wert
<b>C7453T</b>				
CC	1512 (82,40)	0,55	1559 (81,32)	0,7255
CT	305 (16,62)		338 (17,63)	
TT	18 (0,98)		20 (1,04)	
<b>C7624T</b>				
CC	1075 (60,80)	0,4376		
CT	600 (33,94)			
TT	93 (5,26)			
<b>T12777G</b>				
TT	939 (52,49)	0,7434	954 (50,03)	0,8997
TG	718 (40,13)		788 (41,32)	
GG	132 (7,38)		165 (8,65)	
<b>T18012G</b>				
TT	1495 (84,99)	0,9336		
TG	253 (14,38)			
GG	11 (0,63)			
<b>T21139A</b>				
TT	1609 (88,75)	0,6582	1691 (87,94)	0,8676
TA	199 (10,98)		225 (11,70)	
AA	5 (0,28)		7 (0,36)	

### 3.3 Auswertung der Assoziationsergebnisse

Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen SNPs im CLNS1A-Gen, Asthma und veränderten Lungenfunktionsparametern. Aus diesem Grund wurde initial die unter 2.1.2.2 beschriebene Asthma-Fall-Kontroll-Population für die Assoziationsstudie herangezogen. Die in 3.3.2 und 3.3.3 dargestellten Analysen ergaben jedoch zusätzliche Effekte zu atopischen Phänotypen z.B. Heuschnupfen in Kombination mit Asthma. Um nun zu verifizieren, ob diese Effekte unabhängig von der Asthmaerkrankung oder nur in Kombination miteinander zu beobachten sind, wurden die signifikant assoziierten SNP zusätzlich in einer Querschnittspopulation (siehe 2.1.2.1) genotypisiert und auf ihre Reproduzierbarkeit hin analysiert.

### 3.3.1 CLNS1A und Asthma bronchiale

Die Auswirkungen von CLNS1A-Polymorphismen auf die Entstehung von kindlichem Asthma wurden in der Asthma-Fall-Kontroll-Population untersucht.

Zwischen den genotypisierten SNPs im CLNS1A-Gen und Asthma bronchiale konnte kein statistischer Zusammenhang nachgewiesen werden. Auch die Betrachtung von atopischen und nicht-atopischen Asthma lässt keine signifikante Assoziation zu den untersuchten SNPs erkennen. Gleiches gilt für die bronchiale Hyperreaktivität (BHR).

Die Ergebnisse können Tabelle 20 und 21 entnommen werden.

**Tabelle 20: Assoziationen zwischen untersuchten SNPs und Asthma (BHR) in der Fall-Kontroll- und Querschnittspopulation**

SNP/ Phänotyp	Fall-Kontroll-Population			Querschnittspopulation
	Asthma	Atopisches Asthma	Nicht-atopisches Asthma	Asthma
<b>C7453T</b>	1,01 (0,74-1,38)	1,07 (0,71-1,62)	0,91 (0,58-1,40)	0,79 (0,49-1,27)
	p=0,937	p=0,746	p=0,744	p=0,370
<b>C7624T</b>	0,82 (0,64-1,05)	0,77 (0,55-1,09)	0,97 (0,69-1,36)	
	p=0,135	p=0,148	P=0,932	
<b>T12777G</b>	1,08 (0,85-1,36)	1,23 (0,89-1,70)	0,91 (0,66-1,27)	1,17 (0,83-1,65)
	p=0,545	p=0,246	p=0,615	p=0,384
<b>T18012G</b>	1,12 (0,81-1,55)	1,20 (0,77-1,86)	0,94 (0,59-1,51)	
	p=0,497	p=0,414	p=0,906	
<b>T21931A</b>	0,94 (0,64-1,37)	0,84 (0,48-1,44)	0,97 (0,58-1,64)	1,00 (0,59-1,7)
	p=0,775	p=0,599	p=1,000	p=1,000

**Tabelle 21: Assoziationen zwischen untersuchten SNPs und bronchialer Hyperreaktivität (BHR) in der Fall-Kontroll-Population**

SNP/ Phänotyp	Fall-Kontroll-Population BHR
<b>C7453T</b>	1,02 (0,73-1,44)
	p=0,930
<b>C7624T</b>	0,94 (0,71-1,24)
	p=0,671
<b>T12777G</b>	1,06 (0,81-1,39)
	p=0,678
<b>T18012G</b>	1,05 (0,70-1,57)
	p=0,837
<b>T21931A</b>	1,08 (0,71-1,63)
	p=0,751

### 3.3.2 CLNS1A und Heuschnupfen

Der genotypisierte SNP C7453T zeigt bei der Betrachtung im rezessiven Modell einen Trend für die Entstehung von Heuschnupfen in der Fall-Kontroll-Population (OR 2,78; 95% CI, 0,79-9,82;  $p = 0,098$ ). Die Probanden der Fall-Kontroll-Population wurden vor dem Hintergrund Asthma versus supernormale Kontrollen selektioniert. Diese Population eignet sich somit nicht für eine hinreichende Beurteilung einer Assoziation zwischen Polymorphismen und dem Phänotyp Heuschnupfen unabhängig von einer Asthmaerkrankung. Aus diesem Grund wurde dieser SNP zusätzlich in der Querschnittspopulation MD genotypisiert und ausgewertet. Dabei zeigt C7453T ebenfalls eine grenzwertig signifikante Erhöhung des Risikos an Heuschnupfen zu erkranken (OR 2,33; 95% CI, 0,95-5,72;  $p = 0,058$ ). Auch hier handelt es sich um einen Homozygoten-Effekt (siehe Tabelle 22).

**Tabelle 22: Assoziation zwischen untersuchten SNPs und Heuschnupfen in der Fall-Kontroll- und Querschnittspopulation; die Homozygoten-Effekte für den SNP C7453T sind *kursiv* gedruckt; grenzwertig signifikante Ergebnisse sind mit ein <sup>+</sup> markiert**

	Fall-Kontroll-Population	Querschnittspopulation
SNP/ Phänotyp	Heuschnupfen	Heuschnupfen
<b>C7453T</b>	1,25 (0,80-1,95)	1,17 (0,0-1,71)
	$p=0,339$	$p=0,420$
<i>Homozygoten-Effekt</i>	<i>2,78 (0,79-9,82)</i>	<i>2,33 (0,95-5,72)</i>
	<i><math>p=0,098^+</math></i>	<i><math>p=0,058^+</math></i>
<b>C7624T</b>	0,79 (0,54-1,17)	
	$p=0,252$	
<b>T12777G</b>	1,11 (0,77-1,59)	0,91 (0,67-1,24)
	$p=0,580$	$p=0,583$
<b>T18012G</b>	1,23 (0,76-1,99)	
	$p=0,434$	
<b>T21931A</b>	1,05 (0,60-1,83)	0,98 (0,61-1,58)
	$p=0,885$	$p=1,000$

### 3.3.3 CLNS1A und Neurodermitis

In einer ersten Trendanalyse mittels Armitage-Trend-Test kann in der Asthma-Fall-Kontroll-Population eine stark signifikante Assoziation zwischen der Variation T21391A und dem Erkrankungsrisiko für Neurodermitis beobachtet werden (OR 1,79; 95% CI, 1,24-2,59;  $p = 0,002$ ). Grenzwertig signifikant ist auch die Assoziation zwischen Neurodermitis und dem SNP T12777G (OR 1,22; 95% CI, 0,99-1,5;  $p = 0,066$ ) im Armitage-Trend-Test für die Fall-Kontroll-Population. Die Ergebnisse dieser ersten Trendanalyse sind in der vorliegenden Arbeit tabellarisch nicht dargestellt.



## ERGEBNISSE

Berechnungen nach dem dominanten Modell bestätigen die Ergebnisse der Trendanalyse (Tabelle 23): T21931A zeigt einen starken statistischen Zusammenhang zu Neurodermitis bei gleichzeitig bestehendem Asthma (OR 1,79; 95% CI, 1,23-2,62;  $p = 0,003$ ) und auch T12777G weist eine signifikante Assoziation zu dieser Erkrankung auf (OR 1,65; 95% CI, 1,02-2,66;  $p = 0,043$ ), jedoch zeigt sich hier der Effekt nur bei homozygotem Vorliegen des selteneren Allels (rezessives Modell). Es ist zu beachten, dass die Variable Neurodermitis für die Probanden aus Leipzig innerhalb der Fall-Kontroll-Population MDL nicht vorliegt und daher nur die Probanden aus München und Dresden bei diesen Berechnungen eingeschlossen wurden.

Wie unter 3.3.2 am Beispiel Asthma mit Heuschnupfen bereits beschrieben eignet sich die Fall-Kontroll-Population auf Grund der speziellen Populationszusammenstellung nicht für eine generelle Beurteilung von Assoziationen zwischen untersuchten Polymorphismen und Neurodermitis, da in der Asthma-Fall-Kontroll-Population bei fast allen Kindern mit Neurodermitis auch eine Asthma-Erkrankung vorliegt. Um die Frage zu klären, ob die beobachteten Effekte auch unabhängig von Asthma auftreten, wurden Berechnungen für die beiden SNPs T12777G und T21931A in einer Querschnittspopulation (Dresden N=1940) durchgeführt, um ein Asthma-unabhängiges Neurodermitis-Risiko zu evaluieren. Dabei zeigt T12777G bei der Betrachtung Wildtyp versus Mutation nur noch eine grenzwertig signifikante Assoziation mit Neurodermitis (OR 1,46; 95% CI, 0,98-2,19,  $p = 0,062$ ). Eine statistisch signifikante Assoziation von T21931A zu Neurodermitis kann in der Querschnittspopulation nicht beobachtet werden (OR 1,32; 95% CI, 0,93-1,87,  $p = 0,131$ ). Siehe dazu Tabelle 23.

**Tabelle 23: Assoziationen zwischen untersuchten SNPs und Neurodermitis in der Fall-Kontroll- und Querschnittspopulation; die Homozygoten-Effekte für den SNP T12777G sind *kursiv* gedruckt; M=München, D=Dresden; statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern \* versehen ( $p=0,05$ ).**

	Fall-Kontroll-Population (nur M, D)	Querschnittspopulation (nur D)
SNP/ Phänotyp	Neurodermitis	Neurodermitis
C7453T	0,97 (0,67-1,40)	1,07 (0,79-1,45)
	$p=0,926$	$p=0,638$
C7624T	0,90 (0,68-1,19)	
	$p=0,481$	
T12777G	1,20 (0,91-1,56)	1,01 (0,80-1,29)
	$p=0,195$	$p=0,951$
<i>Homozygoten-Effekt</i>	<i>1,65 (1,02-2,66)</i>	<i>1,46 (0,98-2,19)</i>
	<i><math>P=0,043^*</math></i>	<i><math>p=0,062</math></i>
T18012G	0,82 (0,56-1,20)	
	$p=0,350$	
T21931A	1,79 (1,23-2,62)	1,32 (0,93-1,87)
	$p=0,003^*$	$p=0,131$

### 3.3.4 CLNS1A und Reaktionen im Haut-Prick-Test (Atopisch =3mm)

Es konnte keine statistisch signifikante Assoziation zwischen Polymorphismen im CLNS1A-Gen und einer positiven Reaktion im Haut-Prick-Test nachgewiesen werden (Tabelle 24).

**Tabelle 24: Assoziationen zwischen untersuchten SNPs und Atopie in der Fall-Kontroll- und Querschnittpopulation**

	<b>Fall-Kontroll-Population</b>	<b>Querschnittpopulation</b>
<b>SNP/ Phänotyp</b>	<b>Atopie</b>	<b>Atopie</b>
<b>C7453T</b>	1,22 (0,87-1,71)	1,13 (0,87-1,47)
	p=0,247	p=0,375
<b>C7624T</b>	0,85 (0,64-1,13)	
	p=0,286	
<b>T12777G</b>	1,11 (0,85-1,46)	1,02 (0,82-1,25)
	p=0,449	p=0,916
<b>T18012G</b>	1,08 (0,74-1,57)	
	p=0,695	
<b>T21931A</b>	0,85 (0,54-1,34)	0,93 (0,67-1,28)
	p=0,582	p=0,684

### 3.3.5 Zusammenfassung: Assoziationen zwischen CLNS1A-Polymorphismen und atopischen Phänotypen

Von den insgesamt 20 identifizierten SNPs im CLNS1A-Gen wurden auf Grund von Kopplungsverhalten und besonderen Auswahlkriterien (siehe 3.1.2) sechs erfolgreich mit Hilfe der Methode der MALDI-TOF genotypisiert. In anschließenden Assoziationsstudien sollten fünf SNPs primär auf ihren Zusammenhang mit Asthma in einer Fall-Kontroll-Population untersucht werden. Eine statistische Assoziation zu Asthma bronchiale konnte dabei nicht nachgewiesen werden. Es ergaben sich jedoch Effekte zu weiteren atopischen Phänotypen in Kombination mit Asthma: Die mit 12 weiteren SNPs gekoppelte Variation C7453T zeigt bei der Betrachtung Wildtyp versus homozygot Mutation einen Trend für die Entstehung von Heuschnupfen bei gleichzeitig bestehender Asthma-Erkrankung in der Fall-Kontroll-Population (OR 2,78; 95% CI, 0,79-9,82; p = 0,098). Um zu prüfen, ob diese Assoziation unabhängig von Asthma ist, wurden zusätzlich Berechnungen in einer Querschnittpopulation durchgeführt.

Auch dabei zeigt C7453T einen Homozygoten-Effekt mit einem grenzwertig signifikant erhöhtem Erkrankungsrisiko für Heuschnupfen bei Vorliegen des TT-Genotyps (OR 2,33; 95% CI, 0,95-5,72;  $p = 0,058$ ).

In Bezug auf Neurodermitis weisen zwei SNPs signifikante Assoziationen zu Neurodermitis in Kombination mit Asthma auf: T21391A (OR 1,79; 95% CI, 1,23-2,62;  $p = 0,003$ ) und T12777G (OR 1,65; 95% CI, 1,02-2,66;  $p = 0,043$ ; hier Homozygoten-Effekt). In weiteren Analysen in der Querschnittspopulation Dresden lässt sich lediglich für T12777G eine grenzwertig signifikante Assoziation für ein erhöhtes Erkrankungsrisiko finden (OR 1,46; 95% CI, 0,98-2,19,  $p = 0,062$ ). Auch dabei handelt es sich um einen Homozygoten-Effekt.

### **3.3.6 CLNS1A und Lungenfunktionsparameter**

Da in der vorliegenden Arbeit von der Hypothese ausgegangen wurde, dass Veränderungen im CLNS1A-Gen primär auf das Organ Lunge selbst Einfluss haben könnten, wurden ebenfalls in Assoziationsstudien die Auswirkungen der ausgewählten Polymorphismen auf die Lungenfunktion untersucht. So wurden die Auswirkungen der CLNS1A Polymorphismen auf die folgenden Lungenfunktionsparameter untersucht: der maximale expiratorische Fluss bei 25%, 50%, 75% der Vitalkapazität (MEF25, MEF50, MEF75), die Einsekundenkapazität (FEV1) sowie die forcierte Vitalkapazität (FVC), angegeben jeweils als Prozent vom Sollwert (Ist%/ Soll). Dabei wurden die Probanden mit vollständig vorliegenden Lungenfunktionsuntersuchungen der Städte München, Leipzig und Dresden zunächst einzeln betrachtet und schließlich zusammengefasst.

#### **3.3.6.1 C7624T und Lungenfunktionsparameter**

Die Auswertung der Effekte von C7624T auf die untersuchten Lungenfunktionsparameter zeigt in allen drei Städten eine Reduktion sämtlicher untersuchter Parameter bei Vorliegen des TT-Genotyps (homozygot Mutation). In der Dresdner Population kommt es im Fall des TT-Genotyps zu einer signifikanten Abnahme der FEV1 sowie der FVC, ähnlich der Leipziger Population, die ebenfalls eine signifikante Abnahme der FVC aufweist. Bei der Betrachtung aller drei Städte gemeinsam zeigt sich die signifikante Reduktion von MEF75, FEV1 und FVC bei Vorliegen des TT-Genotyps noch deutlicher. Die durchgeführten Berechnungen eines rezessiven Modells (Wildtyp + Heterozygote vs. Mutation) zeigen ebenfalls eine signifikante Abnahme von MEF50, MEF75, FEV1 und FVC (siehe Tabelle 26). Bei der getrennten Betrachtung von Fällen und Kontrollen (Tabelle 27) fällt auf, dass die beobachteten

## ERGEBNISSE

Veränderungen der Lungenfunktionsparameter wie folgt in der Fall-Kontroll-Population verteilt sind: während in der Asthma-Gruppe sämtliche betrachteten Lungenfunktionsparameter eine signifikante Abnahme bei Vorliegen des TT-Genotyps zeigen, sind in der gesunden Kontroll-Gruppe keine signifikanten Veränderungen zu finden. Alle Daten zur Lungenfunktionsparameter-Analyse von C7624T sind in Tabelle 25 bis 27 dargestellt.

**Tabelle 25: Übersicht der Lungenfunktionsparameter für C7624T (N=Anzahl der Probanden, p<0,05\*)**

<b>C7624T</b>	<b>München (N)</b>	<b>Dresden (N)</b>	<b>Leipzig (N)</b>	<b>alle</b>
	<b>mittlere FVC (Ist%/Soll)</b>			
CC	101,53 (217)	99,48 (287)	96,45 (231)	99,13 (735)
CT	101,43 (127)	98,49 (169)	95,75 (126)	98,56 (422)
TT	101,57 (21)	94,45 (27)	89,41 (17)	95,43 (65)
p-Wert	0,995	<b>0,05*</b>	<b>0,027*</b>	<b>0,023*</b>
	<b>mittlere FEV1 (Ist%/Soll)</b>			
CC	99,57 (217)	100,05 (287)	102,45 (231)	100,67 (735)
CT	100,36 (127)	98,80 (169)	102,24 (126)	100,30 (422)
TT	97,80 (21)	94,28 (27)	96,44 (16)	95,98 (64)
p-Wert	0,535	<b>0,017*</b>	0,107	<b>0,003*</b>
	<b>mittlere MEF75 (Ist%/Soll)</b>			
CC	99,10 (217)	100,14 (287)	94,55 (231)	98,08 (735)
CT	99,71 (127)	99,06 (169)	97,20 (126)	98,70 (422)
TT	92,99 (21)	92,80 (27)	88,53 (17)	91,74 (65)
p-Wert	0,294	0,161	0,083	<b>0,016*</b>
	<b>mittlere MEF50 (Ist%/Soll)</b>			
CC	97,17 (217)	98,19 (287)	91,00 (231)	95,63 (735)
CT	97,47 (127)	98,06 (169)	93,60 (126)	96,55 (422)
TT	88,38 (21)	91,48 (27)	88,18 (17)	89,61 (65)
p-Wert	0,236	0,335	0,283	0,055
	<b>mittlere MEF25 (Ist%/Soll)</b>			
CC	94,36 (215)	101,13 (283)	93,06 (231)	96,58 (729)
CT	98,49 (124)	98,85 (168)	95,51 (126)	97,74 (418)
TT	89,52 (21)	90,74 (26)	93,65 (17)	91,11 (64)
p-Wert	0,398	0,232	0,611	0,246

## ERGEBNISSE

**Tabelle 26: Übersicht der Lungenfunktionsparameter; Berechnung nach rezessivem Modell (N=Anzahl der Probanden, p<0,05\*)**

<b>C7624T</b>	<b>München (N)</b>	<b>Dresden (N)</b>	<b>Leipzig (N)</b>	<b>alle (N)</b>
	<b>mittlere FVC (Ist% /Soll)</b>			
CC+CT	101,49 (344)	99,11 (456)	96,20 (357)	98,92 (1157)
TT	101,57 (21)	94,45 (27)	89,41 (17)	95,43 (65)
p-Wert	0,972	<b>0,025*</b>	<b>0,009*</b>	<b>0,009*</b>
	<b>mittlere FEV1 (Ist% /Soll)</b>			
CC+CT	99,87 (344)	99,59 (456)	102,38 (357)	100,53 (1157)
TT	97,80 (21)	94,28 (27)	96,44 (16)	95,98 (64)
p-Wert	0,375	<b>0,01*</b>	<b>0,035*</b>	<b>0,001*</b>
	<b>mittlere MEF75 (Ist% /Soll)</b>			
CC+CT	99,33 (344)	99,74 (456)	95,48 (357)	98,30 (1157)
TT	92,99 (21)	92,80 (27)	88,53 (17)	91,74 (65)
p-Wert	0,124	0,069	0,09	<b>0,005*</b>
	<b>mittlere MEF50 (Ist% /Soll)</b>			
CC+CT	97,28 (344)	98,14 (456)	91,91 (357)	95,96 (1157)
TT	88,38 (21)	91,48 (27)	88,18 (17)	89,62 (65)
p-Wert	0,09	0,139	0,391	<b>0,021*</b>
	<b>mittlere MEF25 (Ist% /Soll)</b>			
CC+CT	95,87 (339)	100,28 (451)	93,92 (357)	97,0 (1147)
TT	89,52 (21)	90,74 (26)	93,65 (17)	91,11 (64)
p-Wert	0,407	0,125	0,96	0,122

**Tabelle 27: Lungenfunktionsergebnisse für den SNP C7624T: getrennt nach Fällen und Kontrollen (N=Anzahl der Probanden, p<0,05\*)**

<b>C7624T</b>	<b>Fälle (N)</b>	<b>Kontrollen(N)</b>
	<b>mittlere FVC (Ist%/Soll)</b>	
CC	99,31 (280)	99,02 (455)
CT	98,20 (159)	98,78 (263)
TT	93,22 (23)	96,65 (42)
p-Wert	<b>0,026*</b>	0,371
	<b>mittlere FEV1 (Ist%/Soll)</b>	
CC	99,18 (280)	101,58 (455)
CT	98,47 (159)	101,40 (263)
TT	90,70 (22)	98,74 (42)
p-Wert	<b>0,002*</b>	0,231
	<b>mittlere MEF75 (Ist%/Soll)</b>	
CC	94,77 (280)	100,11 (455)
CT	94,73 (159)	101,10 (263)
TT	79,99 (23)	98,18 (42)
p-Wert	<b>0,001*</b>	0,571
	<b>mittlere MEF50 (Ist%/Soll)</b>	
CC	90,37 (280)	98,86 (455)
CT	91,96 (159)	99,33 (263)
TT	78,29 (23)	95,82 (42)
p-Wert	<b>0,021*</b>	0,594
	<b>mittlere MEF25 (Ist%/Soll)</b>	
CC	90,42 (276)	100,33 (453)
CT	94,32 (157)	99,79 (261)
TT	79,84 (23)	97,44 (41)
p-Wert	0,077	0,819

### 3.3.6.2 C7453T und Lungenfunktionsparameter

C7453T als weiterer untersuchter SNP im CLNS1A-Gen weist keine eindeutigen Auswirkungen auf die Lungenfunktionsparameter auf. In der Leipziger Population kommt es zwar für die MEF25, die MEF50 und die FEV1 zu einer signifikanten bzw. grenzwertig signifikanten Zunahme bei Vorliegen des TT-Genotyps, jedoch bestätigen die Ergebnisse der anderen Städte diesen Effekt nicht. Lediglich in der Münchner Population kann für die MEF50 ebenfalls eine signifikante Zunahme bei Vorliegen des TT-Genotyps gefunden werden (siehe Tabelle 28).

**Tabelle 28: Übersicht der Lungenfunktionsparameter für C7453T (N=Anzahl der Probanden, p<0,05\*)**

<b>C7453T</b>	<b>München (N)</b>	<b>Dresden (N)</b>	<b>Leipzig (N)</b>	<b>alle</b>
	<b>mittlere FVC (Ist%/Soll)</b>			
CC	101,32 (319)	98,89 (411)	96,36 (287)	98,94 (1017)
CT	102,53 (50)	99,65 (80)	94,64 (86)	98,32 (216)
TT	104,92 (7)	97,97 (7)	99,00 (2)	101,14 (16)
p-Wert	0,48	0,813	0,369	0,503
	<b>mittlere FEV1 (Ist%/Soll)</b>			
CC	99,17 (319)	99,50 (411)	102,80 (287)	100,32 (1017)
CT	101,83 (50)	98,97 (80)	100,03 (86)	100,05 (216)
TT	103,12 (7)	98,97 (7)	110,50 (2)	102,22 (16)
p-Wert	0,163	0,911	0,068	0,725
	<b>mittlere MEF75 (Ist%/Soll)</b>			
CC	97,69 (319)	99,34 (411)	95,41 (287)	97,71 (1017)
CT	101,70 (50)	98,74 (80)	94,36 (86)	97,68 (216)
TT	102,55 (7)	99,71 (7)	114,50 (2)	102,80 (16)
p-Wert	0,311	0,967	0,225	0,545
	<b>mittlere MEF50 (Ist%/Soll)</b>			
CC	95,24 (319)	97,72 (411)	92,54 (287)	95,48 (1017)
CT	103,87 (50)	97,71 (80)	88,85 (86)	95,61 (216)
TT	99,58 (7)	101,22 (7)	112,50 (2)	101,91 (16)
p-Wert	<b>0,048*</b>	0,921	0,057	0,498
	<b>mittlere MEF25 (Ist%/Soll)</b>			
CC	94,10 (314)	100,28 (406)	95,65 (287)	97,03 (1007)
CT	101,29 (50)	97,97 (79)	87,16 (86)	94,42 (215)
TT	97,10 (7)	98,23 (7)	122,00 (2)	101,10 (16)
p-Wert	0,365	0,822	<b>0,002*</b>	0,416

### 3.3.6.3 T12777G und Lungenfunktionsparameter

Die Effekte von T12777G auf die Lungenfunktion zeigen sich im Städtevergleich ebenfalls uneinheitlich: während in der Dresdner Population eine signifikante Zunahme von MEF25, MEF50 und MEF75 bei Vorliegen des GG-Genotyps (homozygot Mutation) zu beobachten ist, sind die Effekte des SNPs in den Städten München und Leipzig nicht statistisch signifikant und zeigen auch keinen gemeinsamen Trend (siehe Tabelle 29).

**Tabelle 29: Übersicht der Lungenfunktionsparameter für T12777G (N=Anzahl der Probanden, p<0,05\*)**

<b>T12777G</b>	<b>München (N)</b>	<b>Dresden (N)</b>	<b>Leipzig (N)</b>	<b>alle</b>
	<b>mittlere FVC (Ist% /Soll)</b>			
TT	102,07 (201)	98,25 (256)	95,78 (202)	98,66 (659)
TG	101,15 (144)	99,58 (181)	96,30 (138)	99,09 (463)
GG	99,17 (20)	99,8 (35)	96,46 (28)	98,56 (83)
p-Wert	0,381	0,361	0,878	0,774
	<b>mittlere FEV1 (Ist% /Soll)</b>			
TT	100,28 (201)	98,48 (256)	102,38 (201)	100,54 (1052)
TG	99,48 (144)	100,06 (181)	102,14 (138)	100,50 (463)
GG	97,09 (20)	101,60 (35)	102,14 (28)	100,70 (83)
p-Wert	0,376	0,119	0,98	0,87
	<b>mittlere MEF75 (Ist% /Soll)</b>			
TT	99,23 (201)	96,79 (256)	96,28 (202)	97,38 (659)
TG	99,32 (144)	101,66 (181)	94,90 (138)	98,92 (463)
GG	95,66 (20)	103,75 (35)	91,82 (28)	97,78 (83)
p-Wert	0,685	<b>0,011*</b>	0,367	0,38
	<b>mittlere MEF50 (Ist% /Soll)</b>			
TT	96,52 (201)	95,07 (256)	92,43 (202)	94,70 (659)
TG	97,18 (144)	100,01 (181)	91,73 (138)	96,66 (463)
GG	95,29 (20)	105,78 (35)	88,50 (28)	97,42 (83)
p-Wert	0,928	<b>0,007*</b>	0,542	0,239
	<b>mittlere MEF25 (Ist% /Soll)</b>			
TT	95,18 (199)	97,15 (251)	94,27 (202)	95,65 (652)
TG	96,32 (141)	100,89 (180)	93,56 (138)	97,28 (459)
GG	90,37 (20)	113,12 (35)	93,32 (28)	100,96 (83)
p-Wert	0,758	<b>0,013*</b>	0,95	0,258

### 3.3.6.4 Weitere Ergebnisse der Lungenfunktionsanalyse

Die Untersuchung von T18012G und T21391A auf eine veränderte Lungenfunktion ergaben ebenfalls keine statistisch signifikanten Ergebnisse.

### 3.3.6.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Lungenfunktionsanalyse

In den durchgeführten Lungenfunktionsanalysen zeigt der in Intron 1 identifizierte SNP C7624T eine signifikante Abnahme der MEF75, FEV1 und FVC bei Vorliegen des homozygoten T Allels. Diese Beeinträchtigung der Lungenfunktion ist vor allem bei Asthma-Patienten zu beobachten; C7624T hat keinen Effekt auf die Lungenfunktion von Nicht-Asthmatikern in unserer Studienpopulation.

Der ebenfalls in Intron 1 lokalisierte SNP C7543T führt in der Lungenfunktionsanalyse der Kinder aus Leipzig zu einer überdurchschnittlichen Zunahme von MEF25, MEF50 und FEV1 bei homozygoten Trägern des polymorphen T Allels. Dieser Genotyp ist auch in der Münchner Population mit einer signifikanten Zunahme von MEF50 assoziiert.

Für den Polymorphismus T12777G kann lediglich in der Dresdner Population ein rezessiver Effekt bezogen auf die Erhöhung von Lungenfunktionsparametern (MEF25, MEF50 und MEF75) nachgewiesen werden.

Die beiden SNPs T18012G und T21391A zeigen hingegen keinerlei Auswirkung auf die untersuchten Parameter.

## 3.4 *In silico* Analysen zur Identifizierung einer potentiellen funktionellen

### Relevanz des Polymorphismus C7624T

Im Rahmen der dargestellten Assoziationsstudie zeigt der SNP C7624T signifikante Effekte auf die Beeinträchtigung der Lungenfunktion von Asthma-Patienten in Abhängigkeit des Genotyps (siehe 3.3.6.1). Da dieser SNP in einer intronischen Region (Intron 1) des CLNS1A-Gens, und nicht im Promotor oder Exon, lokalisiert ist, kann somit nicht direkt auf eine funktionelle Relevanz geschlossen werden. Die funktionellen Aufgaben eines intronischen Bereiches sind noch weitgehend unerforscht, jedoch wird angenommen, dass diese Funktionen als cis-regulatorisches Element ausüben. Es wird vermutet, dass ein solches cis-regulatorisches Element über eine Loop-Bildung mit seinem spezifischen Promotor interagiert und dessen Aktivität entweder als Enhancer oder Silencer beeinflussen kann. Es ist somit vorstellbar, dass Intron 1 im CLNS1A-Gen als cis-regulatorisches Element wirkt und Einfluss auf die Gen-Expression in Anhängigkeit des Genotyps des SNPs C7624T nimmt. Um die potentielle funktionelle Relevanz dieser intronischen Region mit dem Polymorphismus C7624T näher zu charakterisieren, wurden *in silico* Analysen durchgeführt.



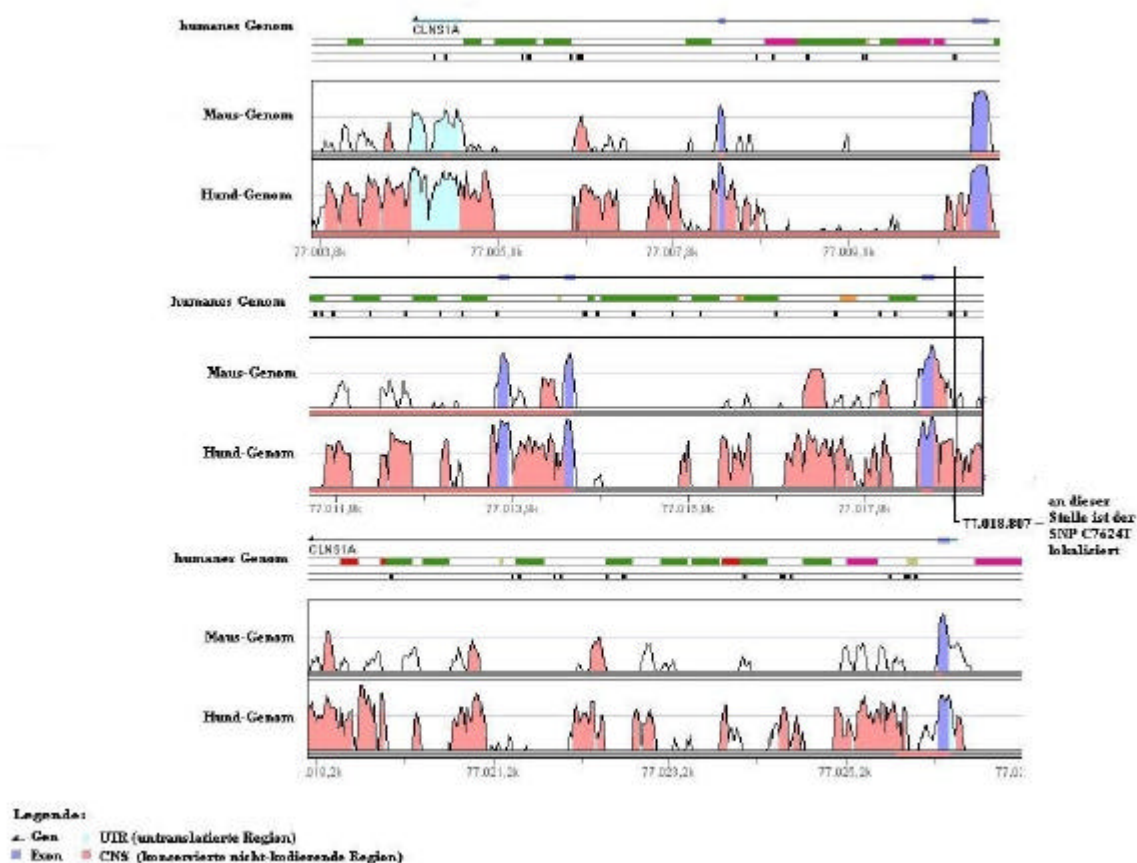
### 3.4.1 Phylogenetische Analyse von C7624T (Vista Browser)

Mit Hilfe des Programms Vista Browser wurde der Konservierungsgrad der intronischen Region des CLNS1A Gens mit dem SNP C7624T zwischen dem menschlichen Genom und dem Genom von Maus und Hund bestimmt. Diese Analyse wurde durchgeführt, da in bereits publizierten Studien gezeigt werden konnte, dass der Grad der Konservierung eines Genbereichs auf dessen funktionellen Einfluss hinweist (BOFFELLI et al. 2003): je konservierter ein definierter Genbereich über die Evolution vorliegt, umso stärker deutet es auf dessen funktionelle Relevanz hin.

Die Analysen des Intron 1 des CLNS1A Gens zeigen, dass die Position, an der C7624T lokalisiert ist, im Hunde-Genom im Vergleich zur humanen Sequenz zu etwa 50% konserviert ist. Mit dem Maus-Genom lässt sich jedoch keine Übereinstimmung finden. Dieses Ergebnis spiegelt die evolutionäre Entwicklung wider, da sich Hund und Menschen im Vergleich zur Maus entwicklungsgeschichtlich wesentlich näher sind.

Die graphische Darstellung der Analyse kann Abb. 20 entnommen werden.

**Abbildung 20: Graphische Darstellung der Vista-Browser-Analyse**



In der phylogenetischen Analyse zeigte sich, dass C7624T in einem konservierten Genbereich von CLNS1A liegt, was die Hypothese unterstützt, dass es sich um einen möglicherweise funktionelle Region handelt.

### 3.4.2 *In silico* Analyse zur Untersuchung von Transkriptionsfaktorbindestellen (MAT-Inspector)

Da in unserer Studienpopulation der SNP C7624T signifikant mit einer Einschränkung von FVC, FEV1 und MEF75 in der Lungenfunktionsanalyse assoziiert ist und sich in einer konservierten Region des CLNS1A Gens befindet, wurden mit Hilfe des Software Programms MAT-Inspector potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen untersucht. Diese Analysen wurden in Abhängigkeit vom Genotyp des SNPs durchgeführt, da sich das Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren verändert und somit ein Einfluss auf die Genregulation ausgeübt werden könnte.

Beim Auftreten des polymorphen Allels des SNPs C7624T in Intron 1 des CLNS1A-Gens konnte eine zusätzliche putative Bindestelle für den Transkriptionsfaktor PRDI-Bindungsfaktor 1 identifiziert werden. Dabei handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der besonders an PRDI-Elemente (positiv regulatory domain I) des Beta-Interferon-Promotors bindet und als Repressor im Rahmen der Gen-Transkription bekannt ist.

Neben C7624T wurde der Promotorbereich des CLNS1A-Gens mit Hilfe von MAT-Inspector auf mögliche Transkriptionsbindestellen analysiert, die die Promoteraktivität möglicherweise beeinflussen könnten. Alle weiteren identifizierten SNPs im CLNS1A-Gen sind intronisch gelegen und zu weit vom Promotor entfernt, als dass diese als cis-regulatorisches Elemente auf den Promotor wirken könnten. Aus diesem Grund wurden keine Transkriptionsfaktorbindungsanalysen durchgeführt.

Sämtliche Ergebnisse der durchgeführten Promotor- bzw. Sequenzanalyse mit Hilfe von MAT-Inspector können Tabelle 30 entnommen werden.

**Tabelle 30: Allelspezifisches Bindeverhalten von Transkriptionsfaktoren**

SNP-Lokalisation	Lage	Vermutete Funktion bei Vorliegen des	
		Wildtyp-Allels (Core/Matrix-Sim.)	Mutations-Allels (Core/Matrix-Sim.)
T-1578C	5'-Promotor	Octamer-Bindungsfaktor 1 (0,807/0,876)	Elk-1 (1,000/0,938) Mitglied des vertebralen HOX-Clusters der Homeobox-Faktoren (1,000/0,950)
G-1452A	5'-Promotor	E2F(Zellzyklusregulation) (1,000/0,791) B-Zell-spezifisch aktivierendes Protein (0,842/0,791)	GLI-Krueppel-verwandter Transkriptionsfaktor, Regulator des Adenovirus E4-Promotors (0,789/0,824)
G-853T	5'-Promotor	Zellzyklus abhängiges Element CDF-1-Bindungsstelle (1,000/0,883) Zinkfinger / POZ-Domäne-Transkriptions- faktor (1,000/0,957)	
C-425G	5'-Promotor	Pu.1 Ets-ähnlicher Transkriptionsfaktor (B-Zellen) (1,000/0,917)	
A-422G	5'-Promotor	Pu.1 Ets-ähnlicher Transkriptionsfaktor (B-Zellen) (1,000/0,917) Sp2, Mitglied der Sp/XKLF Transkriptions- faktoren mit drei C2H2-Zinkfinger in der konservierten carboxyl-terminalen Domäne (0,772/0,807)	
C7624T	Intron 1		PRDI-Bindungsfaktor 1 (1,000/0,820)

### 3.4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der *in silico* Analysen

*In silico* Analysen zeigen, dass der Polymorphismus C7624T in einem konservierten Genbereich von CLNS1A liegt und somit eine potentielle Funktion angenommen werden kann. Diese Hypothese konnte durch Transkriptionsfaktorbindungsanalysen unterstützt werden, da das Auftreten des polymorphen Allels eine putative Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor (TF) PRDI-Bindungsfaktor 1 entsteht. Dieser repressiv wirkende TF könnte möglicherweise einen Einfluss auf die Transkription des CLNS1A Gens ausüben und somit die beobachtete Assoziation mit einer eingeschränkten Lungenfunktion bei Asthma-Patienten erklären.

## 4 DISKUSSION

Nie zuvor wurde das CLNS1A-Gen auf einen Zusammenhang mit Asthma und Atopie hin untersucht. Auf Grund seiner Funktion als Chloridkanal und seiner Lokalisation auf dem Asthma- und Atopie-relevanten Chromosom 11 (11q13.5-14.1) wurde gerade dieses Gen für die vorliegende Arbeit ausgewählt. Zweifellos spielt die Th2-gewichtete Entzündungsreaktion eine zentrale Rolle in der Ätiologie von Asthma bronchiale, jedoch ist bis heute unklar, weshalb Patienten spezifisch an Asthma erkranken und nicht an einer anderen Form von Atopie z.B. atopischer Dermatitis leiden. Die organspezifische Ausprägung der Asthma-Erkrankung lässt vermuten, dass pulmonale Faktoren in der Ätiologie dieser Lungenerkrankung wichtig sind. Anders als in vielen zum Thema Asthmagenetik veröffentlichten Arbeiten handelt es sich in der vorliegenden Arbeit bei CLNS1A also nicht um ein Gen der klassischen immunologischen Kaskade, sondern vielmehr um ein Strukturgen. Die Hypothese, dass Veränderungen in einem Chloridkanal die pulmonale Integrität soweit beeinflussen könnte, dass dies Auswirkungen auf die Lungenfunktion hat und die Entstehung von Asthma als obstruktive Lungenerkrankung beeinflusst, wurde in der vorliegenden Studie untersucht.

In der Mutationsscreening-Population (N= 37) konnten insgesamt 20 SNPs in den untersuchten Bereichen des CLNS1A-Gens identifiziert werden. Aus diesen SNPs wurden sieben *tagging* SNPs ausgewählt, durch die eine Abdeckung aller Genotypen mit einem maximalen Informationsgehalt erreicht wurden. Sechs von den insgesamt sieben *tagging* SNP konnten mit Hilfe der Methode MALDI-TOF MS erfolgreich genotypisiert werden. Aus technischen Gründen konnte jedoch ein SNP mit diesem Verfahren nicht erfolgreich bearbeitet werden (siehe 3.2.1). In die Assoziationsanalysen wurden nur SNPs eingeschlossen, die eine Allelfrequenz von >3% aufwiesen. Da der Polymorphismus G-853T dieses Kriterium in der Fall-Kontroll-Population nicht erfüllte, wurde er für weitere Analysen nicht berücksichtigt. Die verbleibenden fünf SNPs wurden auf Assoziationen mit Lungenfunktionsparametern, Asthma und anderen atopischen Phänotypen in einer Asthma Fall-Kontroll- bzw. in einer Querschnittspopulation untersucht.

Eine statistisch signifikante Assoziation mit dem Erkrankungsrisiko für Asthma konnte mit keinem der getesteten Polymorphismen beobachtet werden. Hinsichtlich veränderter Lungenfunktionsparameter zeigen homozygote Träger des T-Allels für C7624T eine

signifikante Reduktion von MEF75 ( $p=0,016$ ), FEV1 ( $p=0,003$ ) und FVC ( $p=0,023$ ). Betrachtet man Fälle und Kontrollen getrennt, so fällt auf, dass diese Effekte ausschließlich bei den Asthmatikern in der Fall-Gruppe der Population zu finden sind. C7453T zeigt bei Vorliegen des TT-Genotyps eine signifikante Erhöhung der MEF25 in der Leipziger Population ( $p=0,002$ ) und eine signifikante Erhöhung der MEF 50 in der Münchner Population ( $p=0,048$ ). Uneinheitlich im Städtevergleich verhält sich T12777G, bei dem das G-Allel eine signifikante Erhöhung der MEF25 ( $p=0,013$ ), MEF50 ( $p=0,007$ ) und MEF75 ( $p=0,011$ ) ausschließlich in der Dresdner Population aufweist.

Die mit 12 weiteren SNPs gekoppelte Variation C7453T zeigt in der Querschnittspopulation München-Dresden einen Homozygoten-Effekt mit einem grenzwertig signifikant erhöhtem Erkrankungsrisiko für Heuschnupfen bei Vorliegen des TT-Genotyps (OR 2,33; 95% CI, 0,95-5,72;  $p = 0,058$ ).

Zwei Polymorphismen weisen in der Fall-Kontroll-Population eine signifikante Assoziation mit Neurodermitis bei gleichzeitig bestehender Asthmaerkrankung auf: T12777G und T21931A. Da 40%-60% der Patienten mit Neurodermitis gleichzeitig mit einer respiratorischen Atopie wie Asthma bronchiale oder Heuschnupfen belastet sind, eignet sich eine Asthma-Fall-Population nicht dazu, die beobachteten Effekte unabhängig von Asthma zu untersuchen. Daher wurden weitere Analysen mit einer Querschnittspopulation durchgeführt, in denen lediglich T12777G einen Trend für ein erhöhtes Neurodermitisrisiko zeigt (OR 1,46; 95% CI, 0,98-2,19,  $p = 0,062$ ). Dabei handelt es sich um einen Homozygoten-Effekt. Eine statistische Assoziation mit Atopie konnte für keinen der untersuchten Polymorphismen nachgewiesen werden.

Auf Grund der vorliegenden Assoziationsdaten des Polymorphismus C7624T im CLNS1A-Gen mit einer signifikanten Einschränkung von MEF75, FEV1 und FVC bei Asthma-Patienten, wurden *in silico* Analysen durchgeführt. Als intronisch lokalisierter SNP (Intron 1) wurde die Hypothese einer möglichen funktionellen Relevanz als cis-regulatorisches Element aufgestellt. Der funktionelle Einfluss einer genetischen Region kann durch den evolutionären Konservierungsgrad abgeschätzt werden. Daher wurde für Intron 1 mit C7624T eine phylogenetische Analyse durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass der Polymorphismus in einem konservierten Genbereich lokalisiert ist, was für seine mögliche funktionelle Relevanz spricht. Weitere *in silico* Analysen ergaben, dass sich das Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit des Genotypstatus verändert. Eine mögliche

Bindungsstelle für den repressiven Transkriptionsfaktor PRDI-BF1 (positive regulatory domain I-binding factor 1) konnte nur mit dem polymorphen T-Allel detektiert werden. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass es sich bei dieser intronischen Region um einen funktionellen Bereich handelt, der möglicherweise durch den Polymorphismus C7624T beeinflusst wird und somit die Expression des CLNS1A Gens verändern könnte.

In der vorliegenden Arbeit wurden eine Fall-Kontroll-Population sowie eine Querschnittspopulation eingesetzt, um die möglichen Assoziationen zwischen Asthma, atopischen Erkrankungen und Polymorphismen im CLNS1A-Gen zu untersuchen. Mit Hilfe von Elternfragebögen wurde u.a. der pulmonale Status der Kinder erfasst. Alle Kinder mit der Arzt Diagnose Asthma oder mit ärztlich festgestellten, rezidivierenden asthmatischen, spastischen oder obstruktiven Bronchitiden wurden als Asthmatiker in die Fall-Gruppe der Fall-Kontroll-Population eingeschlossen.

Bei dem Einsatz von Fragebögen zur Phänotypbestimmung stößt man allgemein auf das Problem, dass die Eingruppierung durch die Aussagen der Eltern bezogen auf den kindlichen Gesundheitsstatus erfolgt. Somit ist man auf die korrekte Beantwortung der Fragen und die sachgerechte Einschätzung durch die Eltern angewiesen. Im Falle der vorliegenden Studie wurde jedoch die ärztliche Diagnose Asthma sowie objektive Messgrößen wie die Lungenfunktion für die Eingruppierung Phänotyp Asthma gefordert. Man kann daher von einer ausreichenden Phänotyp-Definition ausgehen.

Die Kombination der für diese Arbeit rekrutierten Kinder aus verschiedenen Städten ehemals West- und Ostdeutschlands sowie unterschiedliche Umweltbedingungen könnten die Ergebnisse dieser Arbeit beeinflussen. Bei Betrachtung der Ergebnisse fällt beispielsweise auf, dass sich die Lungenfunktionswerte der einzelnen Städte für einzelne Parameter relativ stark unterscheiden. Da die Lungenfunktionsuntersuchung mittels Spirometrie ein Verfahren ist, welches stark von der *Compliance* des Patienten und der sachgerechten Durchführung des Untersuchers abhängig ist, sind Unterschiede im Untersuchungsgang eine mögliche Ursache. Viele Kinder benötigen für die suffiziente Durchführung der Atemmanöver eine gezielte Vorbereitung. Der Untersucher muss die Kinder so stimulieren können, dass die maximal möglichen Werte erzielt werden können. Aufgrund eines gemeinsamen Trainings bezüglich Untersuchungsdurchführung und –technik sowie eines strengen Durchführungsprotokolls ist jedoch davon auszugehen, dass trotz multizentrischer Durchführung die Untersuchungen äquivalent und die gemessenen Parameter vergleichbar sind. Andernfalls wäre eine gemeinsame Betrachtung nicht zulässig.

Die beobachteten Differenzen in der vorliegenden Assoziationsstudie zwischen den Probanden aus ehemals Ost- und Westdeutschland können vermutlich nicht durch genetisch abweichende Hintergründe erklärt werden. In bereits publizierten Assoziationsstudien der Gene IL-4 und IL-13 wurde kein signifikanter Unterschied bezüglich Allelfrequenzen zwischen Kindern aus West- und ehemals Ostdeutschland nachgewiesen (GRAVES et al. 2000; KABESCH et al. 2003a). Dies lässt den Schluss zu, dass es sich bei Kindern aus den ehemals getrennten Teilen Deutschland um genetisch ähnliche Populationen handelt.

Es ist jedoch wichtig, sein Augenmerk nicht nur auf genetische Divergenzen zwischen den Studienpopulationen der einzelnen Städte zu richten, sondern auch die Exposition unterschiedlicher Umwelteinflüssen in den Analysen zu berücksichtigen. Es wird seit längerem diskutiert, ob neben der genetischen Prädisposition auch Umwelteinflüsse einen tief greifenden Einfluss auf die Entstehung von Asthma und allergischen Erkrankungen haben (KABESCH 2001). Da die untersuchten Kinder aus Leipzig und Dresden die ersten drei Lebensjahre im DDR-System erlebt haben, könnten frühkindliche Unterschiede in der Umwelt Ursache für einen möglicherweise unterschiedlichen immunologischen Status zwischen den rekrutierten Kindern verantwortlich sein. Gerade im frühen Kindesalter übt die Umwelt einen immunmodulatorischen Einfluss aus (HOFFJAN et al. 2005). In diesem Zusammenhang ist eine Untersuchung von WEILAND et al. von Interesse, welche ergab, dass bereits einige Jahre nach der Wiedervereinigung Deutschlands im Jahre 1990 eine steigende Prävalenz der atopischen Erkrankungen in ehemals Ostdeutschland mit Angleichung auf westeuropäisches Niveau verzeichnet werden konnte (WEILAND et al. 1999).

Die genannten Divergenzen zwischen ehemals Ost- und Westdeutschland bezogen auf die frühkindliche Umweltexposition könnten zu nicht-reproduzierbaren Assoziationsdaten für atopische Erkrankungen führen. Des Weiteren könnte man postulieren, dass Umwelteinflüsse, wie z.B. Autoabgase und andere Noxen (Asbest, Ozon) auch direkt auf die Lunge wirken, wodurch Unterschiede ebenfalls in der Lungenfunktion zwischen Ost- und Westdeutschland auftreten könnten. In einer Arbeit von Calderón-Garcidueñas *et al.* wurde nachgewiesen, dass Umwelteinflüsse nicht nur auf das Immunsystem wirken, sondern auch direkt die Lungenfunktion beeinträchtigen können (CALDERON-GARCIDUENAS et al. 2006).

Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte potentiell auf falsch positiven Ergebnissen beruhen, muss man sich generell die Frage nach möglichen methodischen Fehlern stellen. Das Mutationsscreening im CLNS1A-Gen wurde durch Sequenzierung von insgesamt 37 nicht-verwandten Individuen durchgeführt. Bei diesem Stichprobenumfang kann mit einer über 95%igen Wahrscheinlichkeit damit gerechnet werden, dass sämtliche genetische Variationen,

die mit einer Frequenz von 5% oder mehr auftreten, in den untersuchten Genbereichen nachgewiesen wurden. Daher erscheint es unwahrscheinlich, dass relevante Polymorphismen in dem hier durchgeführten Mutationsscreening in den untersuchten Bereichen von CLNS1A übersehen worden sind. Sequenziert wurden 2000 bp der 5'-UTR, alle sieben Exons einschließlich je 500 bp der flankierenden Intronregion sowie 1000 bp der proximalen 3'-UTR. Ausgeschlossen vom Mutationsscreening wurden große Bereiche von Intron 1, 2, 4, 5 und 6. Es besteht daher die Möglichkeit, dass sich in diesen nicht untersuchten Genbereichen weitere Asthma-relevante Polymorphismen finden lassen, wobei es sich insgesamt um große Intronbereiche handelt, deren funktionelle Relevanz bis heute nicht geklärt ist (MATTICK 1994; FEDOROVA und FEDOROV 2003). Weiterhin muss bedacht werden, dass möglicherweise von uns identifizierte SNPs in einem Kopplungsungleichgewicht mit einem oder mehreren SNPs stehen, die in unbearbeiteten Bereichen des Gens oder in einem ganz anderen Gen liegen und für die beobachteten Effekte in den Assoziationsanalysen eigentlich verantwortlich sind. Denkbar wäre dies beispielsweise für die in dieser Arbeit identifizierten SNPs C7453T und T12777G. Analysen haben gezeigt, dass C7453T mit den in der Literatur bereits beschriebenen intronischen SNPs rs4945191 (Intron 1) und rs3781616 (Intron 5) im CLNS1A Gen in einem Kopplungsungleichgewicht stehen. Vergleichbare Ergebnisse wurden zwischen T12777G und dem ebenfalls publizierten Polymorphismen rs7946637 (Intron 2) beobachtet. Da diese Genbereiche außerhalb der untersuchten Regionen des CLNS1A Gens liegen, wurden sie jedoch in unserer Studie nicht eingehender analysiert.

Das Phänomen der Kopplung haben wir uns im Rahmen der Genotypisierung zu Nutze gemacht, da lediglich die *tagging* SNPs untersucht wurden mussten, um alle notwendigen Genotypinformationen zu erhalten. Der Polymorphismus C7453T, der eine Assoziation mit Heuschnupfen in der untersuchten Studienpopulation zeigt, steht mit 12 weiteren SNPs des CLNS1A-Gens in einem engen Kopplungsungleichgewicht. Somit ist nun nicht eindeutig zu sagen, auf welchen von diesen Variationen die beobachteten Effekte zurückzuführen sind. Um dies verifizieren zu können, müssten funktionelle Studien folgen, die eine Aussage über einen regulatorischen Einfluss des jeweiligen SNPs liefern. Erst dann kann der tatsächlich verantwortliche SNP mit dem erhöhten Risiko für die Erkrankung an Heuschnupfen in Zusammenhang gebracht werden.

Durch die Existenz des Pseudogens CLNS1B auf Chromosom 6 wurde das Mutationsscreening nach Polymorphismen in der vorliegenden Arbeit maßgeblich



beeinträchtigt. Das Pseudogen CLNS1B weist eine Sequenzhomologie von mehr als 90% zur kodierenden Region von CLNS1A auf (NAGL et al. 1996). Das Vorhandensein von Pseudogenen erschwert die Auswahl von spezifischen Primern und birgt die Gefahr, versehentlich nicht beabsichtigte Chromosomenabschnitte zu untersuchen. Dieses Problem konnte in der durchgeführten Studie jedoch durch große Sorgfalt in der Primerauswahl und durch intensiven Sequenzvergleich minimiert werden. Außerdem fehlen CLNS1B sämtliche Intronbereiche, so dass alle intronisch gelegenen Primer nicht im Pseudogen binden dürften und somit die Spezifität für die analysierten Fragmente gewährleistet werden kann.

Schlussfolgernd kann somit davon ausgegangen werden, dass alle relevanten SNPs in den untersuchten Genbereichen des CLNS1A Gens identifiziert und unter Anwendung von Kopplungsanalysen alle Genotypinformation gewonnen werden konnten. Gleichzeitig konnte die Abgrenzung zum Pseudogen durch eine sehr restriktive Primerauswahl gewährleistet werden, wodurch methodische Fehlinterpretationen nahezu ausgeschlossen werden können.

Da zwischen den in dieser Studie beschriebenen SNPs und den durchgeführten Assoziationsanalysen primär kein Zusammenhang zwischen Polymorphismen im CLNS1A-Gen und der Beeinflussung der Asthmaprädiposition nachgewiesen werden konnte, muss die initiale Hypothese überdacht werden. Möglicherweise spielen CLNS1A Polymorphismen bei der Entstehung von Asthma eine weniger wichtige Rolle, sind aber offensichtlich in der Nasenschleimhaut bei der Entstehung von Heuschnupfen von Bedeutung. Scheinbar beeinflusst CLNS1A als Strukturgen organspezifisch eher das Erkrankungsrisiko von Heuschnupfen als von Asthma bronchiale.

Der SNP C7453T in Intron 1 des CLNS1A Gens zeigt in der Querschnittspopulation einen Einfluss auf das Erkrankungsrisiko von Heuschnupfen. Wie es zu einem solchen Effekt kommen kann, ist bis jetzt noch weitestgehend unklar. Zum aktuellen Forschungsstand liegen keine Hinweise vor, die einen funktionellen Zusammenhang zwischen Heuschnupfen und einer möglichen Chloridkanalstörung erklären würden. Untersuchungen am ebenfalls für einen Chloridkanal kodierenden cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR)-Gen, welches für die Ausbildung von Mukoviszidose verantwortlich ist, ergaben, dass Patienten mit chronischer Rhinosinusitis im Vergleich zu einer Kontrollgruppe gehäuft Mutationen in diesem Gen aufweisen. Dies erscheint plausibel, bedenkt man, dass Veränderungen in Viskosität und Elektrolytgehalt von nasalem Sekret aufgrund von Mutationen im CFTR-Gen zur Entstehung von chronischer Rhinitis prädisponieren könnten (WANG et al. 2000). Es ist durchaus vorstellbar, dass Mutationen im CLNS1A-Gen ähnliche Auswirkungen auf die

Zusammensetzung des Nasensekrets haben. Auf Grund seiner Steuerungsfunktion auf das Zellvolumen könnten Veränderungen in diesem Gen die Schwellung der nasalen Schleimhäute begünstigen und damit zum klinischen Bild einer chronischen Rhinitis beitragen.

Neben einer Assoziation zu Heuschnupfen weist ein weiterer Polymorphismus (T12777G) ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für Neurodermitis in der Querschnittspopulation (N=1940) auf. Durch diese genetische Variation könnte eine Störung in dem CLNS1A Gen hervorgerufen werden mit einer potentiellen Auswirkung auf die Barrierefunktion der Haut. Ähnlich wie das pulmonale Epithel stellt die Haut eine Grenze zur externen Umwelt dar, die ständig mit Noxen und sensibilisierenden Stoffen in Kontakt tritt. Bei Einschränkungen in der Integrität der Kutis könnten solche sensibilisierenden Stoffe (Allergene) ungehindert in den Körper eindringen und gerade in der Haut die für Neurodermitis typische T-Zell-Antwort auslösen. Aber nicht nur über den direkten Hautkontakt können Allergene im Rahmen einer atopischen Dermatitis auf den Organismus wirken. Auch inhalative Allergene spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der atopischen Dermatitis (SCHAFER et al. 1999). So ist vorstellbar, dass genetische Veränderungen in einem pulmonalen Strukturgen wie dem CLNS1A den Eintritt von Allergenen begünstigen und über diesen Weg die Ausbildung von Neurodermitis beeinflusst wird. Es ist bekannt, dass Neurodermitis und Asthma häufig in Kombination auftritt. Somit ist es nicht weiter verwunderlich, dass der Effekt von T12777G auf das Erkrankungsrisiko von Neurodermitis signifikant in der Fall-Kontroll-Population zu beobachten war. Auf Grund der vorliegenden Populationszusammensetzung, bestehend aus Fällen und Kontrollen in einem 1:2 Verhältnis, werden folglich die beobachteten Effekte besonders deutlich. Entsprechende Analysen der Querschnittspopulation zeigen einen gleichgerichteten Trend in Hinblick auf die Prädisposition für Neurodermitis, jedoch ohne eine statistische Signifikanz zu erreichen.

Bisher gibt es keine Daten, die einen Zusammenhang zwischen Neurodermitis und Störungen in Chloridkanälen beschreiben. Ebenfalls konnte in der Literatur kein Hinweis auf die Expression von CLNS1A in der Haut, z.B. durch Keratinozyten gefunden werden. Wie und ob die beobachteten Effekte von Polymorphismen im CLNS1A-Gen tatsächlich die Entstehung von Neurodermitis und Heuschnupfen beeinflussen, bleibt somit zunächst unklar. Um die vorliegenden Zusammenhänge zwischen Polymorphismen und diesen beiden Phänotypen zu unterstützen, müssen Replikationsstudien in größeren Populationen folgen. Weiterführende funktionelle Untersuchungen könnten einen Aufschluss auf die potentielle

Relevanz der genannten Polymorphismen und deren Einfluss auf die Pathogenese von Neurodermitis und Heuschnupfen liefern.

Besonders erwähnenswert sind die Analysen zur Identifikation von Polymorphismen, die einen negativen Einfluss auf die Lungenfunktion ausüben. Dabei sollte der Einfluss der identifizierten SNPs im CLNS1A Gen auf die Lungenfunktionsparameter untersucht werden. Hochinteressant ist die in Intron 1 identifizierte Variation C7624T mit einer signifikanten Abnahme der Lungenfunktionsparameter MEF75, FEV1 und FVC bei Vorliegen des TT-Genotyps. Die stärkste statistische Signifikanz ist dabei für die Reduktion der FEV1 zu finden. Noch deutlicher wird die Assoziation zwischen dem T-Allel und der Reduktion der Lungenparameter bei den Berechnungen nach dem rezessiven Modell (Wildtyp + Heterozygot vs. Homozygot). Hierbei zeigt zusätzlich die MEF50 eine signifikante Abnahme bei Vorliegen des selteneren Allels. Diese genannten Effekte sind nicht nur bei der Betrachtung der Städte München, Dresden und Leipzig gemeinsam zu finden. Vielmehr ist eine gleichgerichtete Abnahme aller analysierter Lungenfunktionsparametern bei homozygoten Trägern des T-Allels in allen drei Städten ebenfalls getrennt zu beobachten. Dieses gleichsinnige Verhalten unterstreicht die Aussagekraft der jeweiligen Effekte. Für den Polymorphismus C7624T war die FEV1 der Parameter mit den deutlichsten Effekten, widerspiegelt durch eine signifikante Einschränkung bei Probanden des TT-Genotyps. Die FEV1, die Einsekundenkapazität, gilt als der am besten reproduzierbare Parameter einer bronchialen Obstruktion (VOLLMER et al. 1990). Interessanterweise scheinen die beobachteten Effekte von C7624T auf die Lungenfunktion nur bei Asthmatikern eine Rolle zu spielen. Bei der getrennten Betrachtung von Asthmatikern gegenüber gesunden Probanden in der Fall-Kontrollpopulation ist die signifikante Einschränkung der Lungenfunktion lediglich bei den Asthmatikern zu finden. Es ist vorstellbar, dass die Auswirkungen von C7624T erst bei Vorliegen eines schon vorgeschädigten Bronchialsystems zum Tragen kommen. In einem gesunden Bronchialsystem, in dem an sich keine Atemwegsverengung z.B. durch pulmonales Remodeling vorliegt, sind die Effekte von C7624T eventuell zu gering als dass sie klinisch nachweisbar wären.

Ebenfalls in Intron 1 des CLNS1A-Gens wurde der SNP C7453T identifiziert, der eine signifikante Zunahme der MEF25 in der Leipziger Population sowie der MEF50 in der Münchner Population bei Trägern des homozygoten T-Allels aufweist. Diese Effekte decken sich jedoch nicht mit den Ergebnissen der anderen Städte. Es konnte kein gleichgerichteter Trend verzeichnet werden, so dass dieser Zusammenhang in Frage gestellt werden sollte.

Ebenfalls angezweifelt werden sollten die beobachteten Effekte von T12777G auf die Lungenfunktion, die sich nur in der Dresdner Population finden.

Um die Aussagekraft der dargestellten Resultate zu bekräftigen, wurden *in silico*-Analysen durchgeführt. Diese lassen den Schluss zu, dass der Polymorphismus C7624T in Intron 1 tatsächlich eine funktionelle Relevanz haben könnte, da er sich in einem konservierten Genbereich befindet. Durch die Expression des polymorphen Allels könnte eine mögliche Bindestelle für PRDI-binding factor 1 (PRDI-BF1) entstehen (siehe Tabelle 30). Bei PRDI-BF1 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der besonders an PRDI-Elemente (positiv regulatory domain I) des Beta-Interferon-Promotors bindet und die Transkription des Gens unterdrückt (KELLER und MANIATIS 1991). PRDI-BF1 spielt ebenfalls eine tragende Rolle bei der Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen (TURNER et al. 1994). Eine der Funktionen von PRDI-BF1 scheint hierbei die Repression von *c-myc* Proto-Onkogenen zu sein (TURNER et al. 1994; LIN et al. 1997). Die Auswirkungen einer stark beeinträchtigten PRDI-BF1-Funktion auf die B-Zell-Differenzierung spiegelt sich in der Tatsache wider, dass ein Fehlen des PRDI-Lokus bei mehreren humanen malignen Erkrankungen gefunden werden kann, z.B. im Fall der B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome (MOCK et al. 1996). Ren *et al.* konnten nachweisen, dass PRDI-BF1 unabhängig von der Distanz der Binderegion zum Promotor des jeweiligen Gens als aktiver Repressor wirksam ist (REN et al. 1999). Somit ist vorstellbar, dass durch C7624T eine mögliche Bindestelle für PRDI-BF1 in Intron 1 entsteht, wodurch die Expression von CLNS1A unterdrückt wird. Das Resultat wäre eine verminderte Anzahl von Chloridkanälen und damit verbunden ein blockierter oder veränderter Chloridstrom. Die beobachteten Auswirkungen von C7624T auf die Lungenfunktion im Sinne einer obstruktiven Störung würden in ein solches Krankheitsbild passen. Die tatsächlichen Effekte einer möglichen PRDI-BF1-Bindestelle im CLNS1A-Gen auf die Gen-Expression und die funktionellen Folgen müssten in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Aus Versuchen mit Knockout-Mäusen ist bereits bekannt, dass ein vollständiger Ausfall von CLNS1A letale Folgen hat (PU et al. 2000).

Veränderungen in der Chloridpermeabilität von Zellen stellen die Basis einer Vielzahl vererbbarer Erkrankungen wie der zystischen Fibrose beim Menschen dar. Auf Grund seiner biologischen Funktion als Chloridkanal und seiner Lage auf Chromosom 11q13 wurde in der vorliegenden Arbeit das CLNS1A-Gen ausgewählt. In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal Assoziationen zwischen Polymorphismen und atopischen Erkrankungen sowie Lungenfunktionsparametern untersucht. Trotz beschriebener Hinweise auf eine Kopplung von

Asthma und Atopie mit Genen auf Chromosom 11q13 (OBER et al. 1998) konnte kein Zusammenhang zwischen SNPs im CLNS1A-Gen und diesen Erkrankungen in den untersuchten Populationen gefunden werden. Jedoch konnte gezeigt werden, dass der identifizierte Polymorphismus C7624T im CLNS1A-Gen signifikant assoziiert ist mit einer verminderten Lungenfunktion bei Patienten mit einer vorbestehenden Asthmaerkrankung. Auf Grund dieser deutlichen Beeinträchtigung auf die Lungenfunktion von Asthmapatienten kann die Variation C7624T als ein zusätzlicher Risikofaktor im Fall einer Asthmaerkrankung gedeutet werden, der das Maß der Obstruktion zusätzlich modifiziert. Auch für andere obstruktive Lungenerkrankungen wie die Mukoviszidose kann die Kenntnis über C7624T und die beobachteten Auswirkungen von Interesse sein. Die Genotypbestimmung des SNPs C7624T bei Asthmapatienten und Patienten anderer Lungenerkrankungen könnte möglicherweise das Ausmaß der Obstruktion bei diesen Patienten vorhersagen können.

Nicht nur im Rahmen der Diagnostik und Risikoeinschätzung lungenkranker Patienten könnte die Bestimmung des Allelstatus von C7624T von Nutzen sein, sondern auch Auswirkungen auf bereits bestehende Therapiestrategien bei Asthma bronchiale haben. Im klinischen Alltag begegnet man immer wieder Patienten, die nicht auf die eingesetzten Medikamente ansprechen (Non-Responder). Dies könnte auch für den Wirkstoff Nedocromil zutreffen. Nedocromil findet aufgrund seiner Mastzell-stabilisierenden Eigenschaften Anwendung in der prophylaktischen Therapie von Asthma und Heuschnupfen. Untersuchungen ergaben, dass Nedocromil die Funktion des durch CLNS1A kodierten Chloridkanals hemmt (GSCHWENTNER et al. 1996b). Es ist vorstellbar, dass dies der Schlüssel zum Verständnis der Wirkungsweise von Nedocromil ist, da die resultierende Unterbindung des Chloridstroms zu einer über komplexe Mechanismen die Degranulation von Mastzellen verhindert (ALTON und NORRIS 1996). Zum anderen wird beschrieben, dass Nedocromil aufgrund seiner Chloridstrom-hemmenden Eigenschaft Zunahme der Zellgröße vermindern soll. Ferner scheint Nedocromil eine herabgesetzte Reizbarkeit von Nervenendigungen des Bronchialepithels zu vermitteln und auf diesem Wege der Entstehung von Bronchospasmen entgegenzuwirken. Auch dieser Effekt wird der Einflussnahme auf Chloridkanäle zugeschrieben. Wie bereits erwähnt, verändern Mutationen im CLNS1A Gen möglicherweise die Funktionalität des Chloridkanals, was eventuell zu einer eingeschränkten Wirksamkeit von Nedocromil führt. Diese Erkenntnis stellt folglich den Einsatz von Nedocromil bei Mutationsträgern in Frage. Eine Genotypisierung kann im Einzelfall angebracht sein, um die Therapie auf die individuelle genetische Prädisposition abzustimmen und somit die aktuellen Erkenntnisse der Pharmakogenetik anzuwenden.

Primär wurden in der vorliegenden Arbeit keine Effekte zwischen Polymorphismen im CLNS1A Gens und der Entstehung von Asthma und Atopie beobachtet. Zwei der insgesamt 20 identifizierten Polymorphismen zeigen ein grenzwertig erhöhtes Risiko für Heuschnupfen (C7453T) und Neurodermitis (T12777G). Die möglichen Hintergründe für diese Ergebnisse bleiben bislang unklar. Hochinteressante Effekte weist jedoch der Polymorphismus C7624T in Intron 1 auf: dieser SNP ist mit einer signifikanten Einschränkung der MEF75, FEV1 und FVC bei Asthmapatienten in der Lungenfunktionsanalyse assoziiert. Wie die beobachteten Zusammenhänge zwischen C7624T und der Lungenfunktion zustande kommen, könnte möglicherweise auf Veränderungen des Transkriptionsfaktorbindeverhaltens zurückzuführen sein. Das Binden des repressiven Transkriptionsfaktors PRDI-BF1 in Abhängigkeit des Polymorphismus C7624T könnte folglich die Genexpression von CLNS1A beeinträchtigen. Eine daraus resultierende verminderte Expression von CLNS1A könnte gekoppelt sein an eine Reduktion von Chloridkanälen, was zu einem Mukoviszidose-ähnlichen Krankheitsbild führen könnte. Da das CLNS1A Protein neben seiner Funktion als Chloridkanal eine Vielzahl von Interaktionen mit zytosolischen Proteinen und Proteinen des Zytoskeletts eingeht, scheint eine hohe Multifunktionalität des Proteins vorzuliegen. Dies lässt zusätzlichen Raum für Spekulationen, um die beobachteten Effekte auf die Lungenfunktion von Asthmatikern zu erklären. Es bedarf deshalb weiterer funktioneller Untersuchungen, um den Stellenwert von C7624T in der klinischen Diagnostik sowie seine Einbeziehung in die individuelle Therapieplanung bei Patienten mit obstruktiven Lungenerkrankungen zu bestimmen.

### 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Entstehung von Asthma und allergischen Erkrankungen wird sowohl durch genetische Prädisposition als auch durch Umwelteinflüsse bedingt. Während die immunologische Kaskade sowie die Th-2-gewichtete Entzündungsreaktion gut untersucht sind, rücken pulmonale Strukturgene in den Interessensmittelpunkt der Asthmaforschung.

Veränderungen in der Chloridpermeabilität von Zellen stellen die Basis einiger vererbbarer Erkrankungen beim Menschen dar, wie z. B. die Mukoviszidose, welche mit einer veränderten Mukusproduktion exokriner Drüsen einhergeht. In der vorliegenden Arbeit wurde das Strukturgen CLNS1A, welches für einen Chloridkanal kodiert und auf dem Asthma- und Atopie-relevanten Chromosom 11 (11q13.5-14.1) lokalisiert ist, auf Polymorphismen hin untersucht.

Das Mutationsscreening im CLNS1A-Gen wurde an einer Zufallsstichprobe von Atopikern und Nicht-Atopikern (N=37) durchgeführt. Durch Sequenzierung aller Exons mit flankierenden Intronbereichen sowie Promotor und 3'-UTR wurden Polymorphismen in den untersuchten Genbereichen identifiziert. Fünf *tagging* SNPs wurden ausgewählt und mit Hilfe der MALDI-TOF Methode auf einer Asthma-Fall-Kontroll-Population von 1872 Schulkindern (Alter 9-11 Jahre) sowie einer Querschnittspopulation genotypisiert. Anschließend wurden eine Assoziation zu Asthma und Atopie sowie die Auswirkungen auf die Lungenfunktion untersucht.

20 SNPs wurden in den untersuchten Genbereichen des CLNS1A-Gens identifiziert. Im Rahmen der Assoziationsanalysen zeigte der Polymorphismus C7624T bei vorbestehender Asthmaerkrankung eine signifikante Reduktion der MEF75, der FEV1 und der FVC in der Lungenfunktion bei Trägern des homozygoten T-Allels. *In silico*-Analysen zeigten, dass durch den SNP möglicherweise eine Bindestelle für den repressiven Transkriptionsfaktor PRDI-BF1 (positive regulatory domain I-binding factor 1) entsteht, wodurch die Expression von CLNS1A unterdrückt werden könnte.

Des Weiteren konnte eine positive Assoziation zwischen dem Polymorphismus C7453T und Heuschnupfen sowie zwischen T12777G und Neurodermitis in der Querschnittspopulation nachgewiesen werden. Ein Zusammenhang zwischen den untersuchten Polymorphismen und Asthma und Atopie konnte nicht gezeigt werden.

Aus den vorliegenden Daten kann geschlossen werden, dass genetische Veränderungen im CLNS1A-Gen scheinbar Einfluss auf die Lungenfunktion von Kindern mit Asthma bronchiale haben.

### 6 SUMMARY

Genetic predisposition and environmental factors are thought to determine the development of asthma and other allergic diseases. While the immunologic cascade as well as the Th2-shifted inflammatory immune response is already well examined, pulmonary structure genes gain increasing interest and have become a major focus in asthma research.

Chloride channels are in the focus of extensive research because changes in the chloride permeability of cells may influence cell swelling, contractability and mucus production, e.g. changes in the chloride permeability are the basis of cystic fibrosis. Therefore, we screened the CLNS1A-gene, which encodes for a mammalian chloride-channel on chromosome 11q13.5-14.1, for mutations and tested the effect of polymorphisms in this gene on the genesis of asthma and lung function.

Mutation Screening for CLNS1A was performed in 37 randomly selected adult German volunteers. All 7 exons including at least 500 bp of the respective intronic flanking region, approximately 2000 bp of promoter region and 1000 bp of 3'-untranslated region were screened.

Genotyping by MALDI-TOF MS technology was carried out for five *tagging* SNPs in a German case-control study of 1,872 children (9-11 years, ISAAC II) as well in a cross-sectional study population (N =3,099). Subsequent statistical analyses examined the impact on lung function parameters as well as the potential association with asthma and atopy.

In total, 20 SNPs were identified in the CLNS1A gene. Association results revealed that carriers of the homocytot T allele of the polymorphism C7624T in intron 1 developed a significant reduction of MEF75, FEV1 and FVC. *In silico* analysis indicated that this SNP may create a putative binding site for the repressive transcription factor PRDI-BF1 (positive regulatory domain I-binding factor 1), by which the expression of CLNS1A may be suppressed.

Furthermore, a positive association between the polymorphism C7453T and atopic rhinitis as well as between T12777G and atopic dermatitis were detected in the cross-sectional study population. No association between SNPs in the CLNS1A gene and asthma or atopy were observed.

Our results indicate that genetic alteration within the CLNS1A-gene may influence pulmonary function in children with asthma.



## 7 CLNS1A-GENKARTE

LOCUS NT\_033927 , Homo sapiens chromosome 11 reference genomic contig.  
 24660 bp DNA linear CON 04-JAN-2003  
 DEFINITION CLNS1A gene, complete (1981...23630)  
 ACCESSION NT\_033927 REGION: complement(6555334..6530685)  
 VERSION NT\_033927.3 GI:27499280  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Homo sapiens (human)  
 ORGANISM Homo sapiens  
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
 Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 21649)  
 AUTHORS International Human Genome Sequencing Consortium.  
 TITLE The DNA sequence of Homo sapiens  
 JOURNAL Unpublished (2003)  
 COMMENT GENOME ANNOTATION REFSEQ: NCBI contigs are derived from assembled  
 genomic sequence data. They may include both draft and finished  
 sequence.  
 On Jan 4, 2003 this sequence version replaced gi:22064341.  
 This contig has been assembled by NCBI staff from individual clone  
 sequences making use of a tiling path supplied by the sequencing  
 centers.  
 COMPLETENESS: not full length.

FEATURES Location/Qualifiers

mRNA Exon 1 1981...2193  
 Exon2 9882...10020  
 Exon3 13965...14066  
 Exon4 14713...14820  
 Exon5 17112...17283  
 Exon6 20087...20177  
 Exon7 23087...23630

## ORIGIN

```

001 tttttttttt ttttttgaga cagtgtttcg ctcttggttgcc ccaggctgga gtgcaatggc
061 gtgatctcgg ctcaccgcaa cctccgcctc ccgggttcaa gcaattctcc tgccctcagcc
121 tcccagtagt ctaggattac aggcattcgc caccacgcca ggctaattgt gcatttttag
181 tagagacggg gtttctccat gttggtcagg ctggtctcga attcccagcc tcaggtgatac
241 cgtccgcctc ggccctccaaa atgctgggat tacaggcgtg agccattgac accggtgtat
301 tactctttct ctattgcaat tcccctgtct tgataaatag gctctgtcta agcagcagggc
361 acggtgatcc cattgggcag ttacaacagg gttgtatgta actgggttac aggggtgttaa
421 cagggttgct gctgtaattg cccaatgggt tcaccttgcc tgttgccctag acagagctga
481 tttatcaaga tggaaattgt aacagaaaaa cagtaattca cgcagagctg ctgtgcagga
541 gactagagtt tgttgttgtt gttttgagac ggagtctctc tctgtcgccc aggctggagt
601 gccaaaggcgc gacctcggct cactgcaagc tccgcctctc gggttcacgc cattctcccg
661 cttcaacctc ccgagtagct gggactacag gcacctgcca ccacgcccgg ctaattttgt
721 ttttgtatct ttagtcgaga cgggggttca ccgtgttagc caggctgggtc tcgatctcct
781 gtccctcgtga tctgcccgcgc tcggccctcc aaagtgtctgg gattacaagc atgagccact
841 gcaccgggcc tagagtttta tttttactca aatcagtttc ccagagcatt cagggatcaa
901 agtttttttg ttttttgttt tttgttgttt tttttttttt tttgagacgg ggtctcgctc
961 tgtcgcccag gctggagtg c agtggcgcta tctcggtcca ctgcaagctc tgccctcccg
1021 gttcacgcca ttctcctgcc tcagcctccc cagtagctgg gaccacaggc gcctgccacc
1081 acaccgggct aatttttttg tatttttagt agagacgggg tttcaccatg ttagccagaa
1141 tggctcttgat ctctgacct cgtgaccgc ccgctcggc ctcccaaagt gctgggatta
1201 caggcgtgag ccaccgccc cagccaggga tccaagtttt taaggataat ttggcagggtt
1261 ggggaaggcc agtgagtc aa gtagtctgat tgggtgggtg ggagatgaag tcacagggag
1321 ttgaagctgt cctcttgccc tgagtcagtt cctgggttgg tggggagggg gcacaagatc
1381 acatagccag tttatccatc tgggtgggtgcc agctgatcca tcaagtgcag ggtctgcaac
1441 atatctcaag caccgatctt aggtgcagtt tagggagggg cagaatcttg tagcttgca

```

T-1578C

G-1452A

G-853T

# ANHANG

1501 ctgtaatttc taatctaaac cataatttct aatcttgttg ctgatttgtt agtcctacaa  
1561 aggcagtgcca gtccccaggc aagaaggaag tttgttttgg gaaaaggctg tcatcatctt  
1621 tgttttaaac ttcaaactgt aaactaagtt cctcccaaag ttagttcagc ctatatccag C-425G A-422G  
1681 caatgaacaa ggacagtttg gaggttagaa acaacatgga tttgggtagg tcagatcgct  
1741 ttcagtgctc cagttataat tttgcagtg tggtttctact gtgacaatcc tgaggggactt  
1801 cccacagaac cctcagttat tgaagcccaa agcctcagaa atggcgagga agaaggggaa  
1861 ggggtgttgcg cgggtcaaact ccacacgttc ttagccgacc tccgcccgtt ttccctagaat  
1921 gtctcatctc tatggtcgac ggcgttcaga ttccggggca gactaagttg ttcttccggg  
1981 gtgactgcct ctccagggc gggcggtgtg gtgcacgcat tgctgtgctc caactccctc  
2041 agggcctgtg ttgccgcact ctgctgctat gagcttctc aaaagtttcc cgccgcctgg  
2101 gccagcggag gggctcctgc ggcagcagcc agacactgag gctgtgctga acgggaaggg  
2161 cctcggcact ggtacccttt acatcgctga gaggtagggt tcctgggtccc cagcgctggc  
2221 ctctgcgcg ccgcccctct ccttgcctga gcaggcggtg cgaaggagcc gggcaagggg  
2281 cggcctggag gcctgctggg agcggggtct cgtgcccgac gcctcaggga tacctgtagc  
2341 ggggtggaagg ctcgattttt ctagtactcc tccggagtct tccattctct gttttctccg  
2401 gccggaattt ccccttatgg attgtgcttt tttttttttt tttctttttt ttctctttt  
2461 tctttctctg tctctttctc tctttctttt ttcttttttt ctttctttct ttcttttatt  
2521 ttcttttttt ttttttttta aactgcctat ttactggagg tctggcg cgt gcgttgccct  
2581 taacgcacgg tctggtttta agggctctga gtgtgcctgt ctttccggat gaacagatgc  
2641 aggagatgtt cccctctctg ggatacgtag tttcagagcc gactgtggag gacttttaaa  
2701 gtttggttac acaataaaga ttttcttctg taggtatagt aaggagagga acacccttaa  
2761 ctcgacacag acaggggtca tatgcagagg gaccagactc ccgttttggg gtccctggaag  
2821 gaattgccct tttatttggc cacgtggagc actttgggtat tttgacagtc agatagatct  
2881 accgtaaata ttgtggttgt agaacagagg tccctgtttc cttgacatgc agttttcttt  
2941 attttgaagc ctgtaatgac acatcgaaac tttcctgccc ttcagatatg tgttgcttcc  
3001 ccttttgcct catcacttgt ctacagccag agaaaattct ctacttttaa gagctcatgt  
3061 gattactttg gaaccacctg taaaatccag gataatctcc ctatgttact gtcgactggg  
3121 aaccttaatt acgtttgtga agtccctttt gctgtgtaat ataacataat caccgcctag  
3181 acaccagaaa gtgaaggctg tggggccaaa attctgccta ctacagaatc cagagcacia  
3241 aaactgtaaa gaacctctgc tttaaaggga aatttagaca ttgaacaagg tttaggcttc  
3301 aggccagaaa ctgagatagg acatatggat gggaggaaaa gcaagattga ggtgagaggc  
3361 agataatgag tttggtcagg acatgtgtgg agtagttgta catatgaccg tgttgggccc  
3421 ggcgcgggtg ctcacacctg taatccagc actttgggag gctgaggcag gcagatcgct  
3481 tgagcccagg agtttgagat cagcctgggc agcatggcga aaccagctct ctacaaaaaa  
3541 tacaaaaatt agccaggcat ggtggcggcc tgtagtctta gctactcagg aaactgaggt  
3601 gggaggatca cctgagccca ggaggctgag gctgcgggtg gccgtgattg tgcccctgca  
3661 ctccagcctg catgacagag tgagaccctg tctcaaaaaa aaaataaaaa taaaaaaga  
3721 atgtgtatct tgggaaagtg gtattaaaga gagatgtttg gaggtcgtta aagtgttagt  
3781 gtatactcat ggaaatggat tagatatctc agaagagaag aggaccaagt gtagaacctt  
3841 agggatacgc cgacgggtgg gtcatgaaag aagaaacttg agaaaggagg aaggagcagt  
3901 caaaacaaaa tgtgaagagc atatatagg tattgacaag gagatctttg ataattgggg  
3961 aaagcagttt ctttgaagtg gtggaagatg gagcacagat acattcctag ttcccaggca  
4021 ttcttttttt attcatgaca tttctgtatg ttgacgcttc tttcagtatt ataactcctt  
4081 ttgagggaca gtccctgtatt gatttttgca tttagaagaa tttcaaacct aagatccagt  
4141 gtggtggctc acgcctgtaa taccagcact ttgggaggct gaggcgggtg gatcacctga  
4201 tgacaggagt tcaagaccag cctggccaac aatgtgaaac cctgtctcta ctaaaataca  
4261 aaaattatcc ggggtgtggtg gcgtgcacct gtaatccag ctacttggga ggctgaggca  
4321 ggagaatcgc ttgaaccga gaggcggagg ttgtagtaag ccgagatcat gccattgcat  
4381 tccagcctgg gtgacagagt gagactgtct caaaaaaaa aaaaaaagaa aaatttcaaa  
4441 cctaaagaaa agttgtgtta ttactacca tacacccttc acaaagattt attagttaac  
4501 attttgccat gtttatgtct ctgtttttct tttttttctg agccatttga gaattgtcga  
4561 cgttttccac ttctgtttca gaagaacagg gacattatct tgtataacca caatacaatt  
4621 ctcatactaa ggaagtataa ctctttttta gttcttatca gcttttaaaa aattcttagc  
4681 ctgggcaagg tggcttacgc ctgtaatcgc agcacttcgg aaggccaagg tgagcagatc  
4741 ccttgagtc caggagttctt gaccagcctg gacaacatga caaaacccca tctctgcaaa  
4801 gaatacaaaa actgcaaaaa ttagccggtc gtggttgcaac gtgcctgtag tggcagttac  
4861 tatggggagc tgagggtggga ggattacttg agcctgggca gttgaggctg cggtgagctg  
4921 tgatcacact actgcattcc agcctgggtg acagagtga accttgtctc tgaaaaaaat  
4981 taaacattat ttgtttcagc ttttcacaaa caaatctctt atgtttcttc ttttaagattt  
5041 tttttttttt tttttttttg agacagagtc ttgttctgtc gcccaggctg gagtgcagtg  
5101 gcgcgacctt ggctcactgc aagctccgcc tcccgggttt aagcgattct cctgcctcag  
5161 cctcctgagt agctgggact acagacgtgc tccaccacgc ccagctaatt tttgtatttt  
5221 tagtagagac ggggtttcac catgttggcc aggcgtggtc caaattcctg acctcatgat

5281 ccacccacct tggcctccca aagtgtctggg attacaggca tgagccaccg tgccccggcca  
5341 aaataatttt tttgtgtgtg aaacataaat acaaaaaaag ggtataaata cacacacata  
5401 ctgtgtacat atatatacag tccagccgtt ctcatctga gggagtgaag gagaatgccc  
5461 agagatgata aagctggaga aggagagagt catgttcata aatttggtt atagccttta  
5521 ggctttgggt aaactattta gtttgaggca gagagggaca gcaacagatt aggtttggct  
5581 ggacttgggt tagtctctca gatttgtgtt gaaagattta gaatctccgg cttatttcag  
5641 agcttagttt tttataggaa gttgaatttt ttttttttt tgagatgaag tttcactctt  
5701 gttgcccagg ctggaatgca atggcgcaat ctgggtcac cgcaacctcc gcctcctgag  
5761 ttcaagctat tcttttgctt caccctcccg agtagctggg attaacaggc atgcaccacc  
5821 atgcctggct aattttgtat ttttagcaga gatgggattt cccatgttg gtcagacttg  
5881 tctcaaactc ccgaacttag atgatccatc tgccctggcc tcccaagatg ctgggattat  
5941 aggtgttagc cactgcaccc ggccaggaag ttgaattttt atccaaataa ggaagataca  
6001 gaggcatgaa taatataaaa tagacagttt aaaacaggta aaataggtaa tcaaatataa  
6061 attaggtaat ttaaaactta aatttttttt ttgtatctca ttccaaaatt aatcttaaac  
6121 caaataatta agttaaccca aattcaagac ctctcttagc ttctgtctt gtttttcac  
6181 ccgtgtctgg aataaaggac actcaccata ctgtgcaaa agcatttgaa ttcagcaaaa  
6241 catgttctct acatgtttac tctgtgtcta attctcttg tctttccctt ttgactcacg  
6301 gtttcttttg aactgggtat gattaattaa atgttttaga aggatttctt ctagaatata  
6361 tacaagagt aaatgcaaat cagaatttaa tgatcagaca aaacagttat attttttagat  
6421 gatcacagtga aatcttttat gtttctctac atcactttga aagttagaac ttgaatactt  
6481 tcagtagatt tattacaatc atcccagcaa actttaatgg cagcatgtct ggcctatttc  
6541 atcgtggcct ctgctagaat tagaaaatct ggtgggtggg caacaaataa ttcatgtgca  
6601 ataggattta atttgttgtt aatagggtat tgttcaaatt aaaattgcca gattaaatga  
6661 atgtactgtc aaatctcttt tttttttttt ttttttttga gatggagtct ccccgttgcc  
6721 caggcttgag tgtggtagcg tgatcttggg tcaactgcaac ctccgcctcc tggattcaac  
6781 caattctctc gcctcagcct cccaagtagc tgggattaca ggtgcctgcc accacaccca  
6841 gctaattttc gtatttttaa tagagacagg gtttcgcat gttggtagtc tggctggaa  
6901 ctctgacct cagggtgatc atccacctcg gcctcccaa atgctcccaa aattataggc  
6961 ctgagccacc acgctcggct tataatgtca aatctttttt aacatagtaa catgctgttg  
7021 gaaaaaataa gttgttgaaa gtaagttgtt ttcccattta aaaatatctg tgaatattaa  
7081 tatatgattt gcatttgtaa atctgaaaaa gtaaaataca gaaacctagg gtttcttttc  
7141 tttttttatt taaaaaaaaa agaatttaac gattagaata agtgttttta agtggtgaac  
7201 ttggcttctg tcttatagaa tgcataatcc cagttcatgt aaaagattat gagagttcca  
7261 tagcaaatgc tgtgcagagg agcatttgta ttctctctgc actagtaagg aattacagag  
7321 gtattatgat ggctttttaa agtgaaggcc ataatttgat aggcactcat tctatgttta  
7381 ggtttcagtt tttccatgtc gtcattgagt cattcaagtt ttatggctct ggatatttga  
7441 aattattttg gacacccaaa tttggaatgt ttctttctga attgtgataa cgccagaaaa  
7501 tttttgagat cagaaaaggg cagtttattt gctttaaaat aatacagctt ttgtagggga  
7561 ctctgatac ttgggcatta tttcctctcc acattaaaag gaaagcagtg ggcaggaaaag  
7621 atgcatacag cacataacct cattacataa tacaatgttt ctttggaaac agtaggaatg  
7681 agttgttctg gaaaacaatt tgtagagggt ttatcacttt tagctcttta agatttatca  
7741 cttttaggcc aggcgcagtg gctcacgcct gtaatactgg cactttggga ggccgagggtg  
7801 gcagatcacc tgaggctcggg agtttgagac cagcctggcc gtcattggca aaccccatct  
7861 ctattaaaaa taaaaaaatt agcgaggcgt ggtgtcacac gcttgtaatc ccagctactt  
7921 gggaggctga ggcaggagaa tgcctggaac cctggagggt gagattgca tgagccaaga  
7981 tcatgctact gcactccagc ctgggtgaca gagtgaact tcatctcaaa aaaaacaaaga  
8041 tttatcactt ataagcttcc tagttttcct ttactttttt ttttttaata agaattgttg  
8101 atagaaatct ttccacatga cagtgcata atcttactt ttgccttttg aaagtataca  
8161 attaggggca ggggtgtggg gctcatgctt ataatcccag cactttggga ggccgaggcg  
8221 ggtggatcac gaggtcagga gatccagacc atcctggcta acacggtgaa acccctctc  
8281 taaaaataca aaaaattagc cgggtgtggg ggcgggcgcc tgtagtccca gctactgggg  
8341 aggtcagggc aagagaatgg cgtgaaccgc agaggcggag cttgcagcga gccgagatcc  
8401 gccactgcac tccagcctgg gcgacagacc gagactctgt ctaaaaaaa aaaaaaagt  
8461 atacaattac gtaagtttta gtatatttac agagttgtac agttatcacc acaatcta  
8521 aatctgcctt tgtttttggg aatgctttcg gtaactgagg gtcattgtgg tagacattga  
8581 tttcatttag gggaaactgag gtggaaagt catcctcccc ttccactgaa catgagtgat  
8641 ctgagactgt cacactgtca ttgttctctg ccaaggcagt cctaggttct cctgttttac  
8701 ttttgttttt gcttggttag aaattagaca gccaggcttg ttaaaattgt atagaatata  
8761 gaatgataca ggggtcttac ttcattaaat tttaaaaata attcatatag catacagttt  
8821 aaccatttaa acatacaatt cactagtttt tagtctgttt acagaattgt gcaattatca  
8881 ccaccatttt agaataattt cttcacccca aaaagaacct ggtaccagat agcagacatt  
8941 ccctatttcc ttctagccct aggaaccacc tatattgcat taacattttt tttttgactt  
9001 cttcaggatt ttttactttt tttctgctaa gtggtacagc tccagatgga tgaagtatta

# ANHANG

9061 tcagaaaatt agctagcctc tactgaaagc tcaaaatact gatttttggtg atgtgtttcc  
9121 tttgttacac caataaaata tttgcatttg accacatttg agggaaaact agatctagct  
9181 tttctgtggc tttctcttaa agacgttgaa taaatgaaag gcttcagggg atctgtctct  
9241 cagggttaata attatttcct gacttgcggt gagtgtgatt acagccattt catatatatg  
9301 tcttttagtg taggattcat ggagaaatgc atgattacca aggatttatt gcatacttaa  
9361 ctccctgagct ctttggttaac ggttttgaag gatgttaata aaggaatgtg acaagttctg  
9421 ctgtccgata gttcacattc cataagggca catataagac tcattaccac agagttaagt  
9481 gctaaaattt gcaaatcaga aaaggaagag atctttatgg actggtgtag ttgaaggagg  
9541 gcctcatgga agaggggagg atttgcaaaa gcaaagaggg tatttgaaga catacaaaa  
9601 aagagtaagc atgaaagtca tagaaacata catgtgactg aggaaaatgg aatttcaagt  
9661 ctgtttgaat ttatagctag agggaaagag accgtaacag aattgatctt aaagaaaact  
9721 cagtttccac tactgaattt tcttatttta tgaacgtttc taaaaaagta aacttgaatt  
9781 tatttatatg cataaagggtg tccaagctga acttttatat actttgtggt cttacatgag  
9841 gattttactt ctaaaaaata tctactttaa acatgttttt cagccgctg tcttgggttag  
9901 atggctctgg attaggattc tcaactggaat accccaccat tagtttacat gcattatcca  
9961 gggaccgaag tgactgtcta ggagagcatt tgtatgttat ggtgaatgcc aaatttgaag  
10021 gtatgtatgg tgtaatttaa tctaattgct cctttgatag caaattatat tttaaaaaag  
10081 agtctttgag gccgggcacg gtggctcacg cctgtaatcc cagcactctg ggaggccgag  
10141 gcgggaggat cacaaggcca ggagatcgag accatcctgg ctaatacggg gaaaaccogt  
10201 ctctactaaa aaatacaaaa aattagccag gcgtgggtgt gggcgctgt agtcccagct  
10261 actcaggaga ctgaggcagg agaattggtgt gaacctggga ggtggagctt gtagtgagcc  
10321 gagatcatgc cactgcactc cagcctgggc gacaaagtga gactcgtct aaaaaaaaaa  
10381 aaagaaaaaa aagagtcttt gataataatc aatgtaacat tgaggccatt gactcatttt  
10441 gggtagtagt ttattaagca aaatttcagc acagcaactt ggacacttga agttttcaca  
10501 atggatgttc atgtgtgtct gtatatattt ctctatatat acacttagaa ttcttcattt  
10561 attatggata tgtattttcta gcttttctc taaagtttca ctgtttattc tgcctttctc  
10621 tttttaaaaa gcacccttag gggcttggat cagtataccc tgtgcttctc ataatttaag  
10681 atagaactgt ttgttttgt ttcagtagtg ggtctcagtg gttgtagggg ggatatattt  
10741 tccatgggccc tccaccaacc tcaccattcc ccacatttg gcagtgacat ttggttgaa  
10801 agaggaaggg tattattggt gtctagcagt tagatgcca ggatgctatt attatactaa  
10861 atattctgct atgcacagat ggtccccac aacaaagaat tattccatcc aaatgtcagt  
10921 agtgccaagg ttgagaaact gtaggatata aagatttctc agttttgctt tgggataatt  
10981 gcaaagactt gtaaaagtct agtgaagatg ctcatgttta aaataacggg ttgcttttct  
11041 ttgaagtagt gtgtaagaga caatcctatg aagttaccta caaggctatt gctctttcaa  
11101 atttagattt taatatggtt ccagatataa tatgatcatt tatattcagg tgtgaaacta  
11161 tttagtaatt cttaggactt ttggcaagac ctgcctcatt aagtggtaat gactgattca  
11221 gctatctgaa aatatttttg ttataagatt tcaaatctt gccattggaa aaggttcaaa  
11281 gacattttaa aatctagtga agtttgaaaa agaggatgag gaaaagtaaa aggctgttaa  
11341 ccttgggggt tagtagtgta gtaagacttc ctaataaggc atttggcaca aaatttactc  
11401 tccatctaag taaatgcaac tatgatttta taaccaagaa tattatgtgt catgtttagt  
11461 ttaaagcatt cattcatttg cagaaatgag aaaccttgct cttgtcagtc aactccagat  
11521 gctggtgtga aatggcccca aatagtgcag gccattggag gtgggaaagg tacatgcca  
11581 gagaaaggct taggaaatag catttaataa atactagcct aagggcaaaa gcacattgaa  
11641 taagaaaaact ctgtcattag gccgggcaca gtggctcaaa cctgtaatcc caacactttg  
11701 ggaggccaag gggggcagat cacaaggtca agagatcgag accatcctgg ccaacatggt  
11761 gaaaccctgt ctctactaaa aatacaaaaa tttagctggg gtgggtggcg tggcctgtaa  
11821 tcccagctac tcgggaggct gagacatgag aatcacttga acccgggagg tggagggttg  
11881 agtgagctga gatcgcgcca ctgcactcca gcctgggcaa cagagcaaaa cggctcgaaga  
11941 aaagaaaaaa aagtaagaac tctgtcatta acttgctagg caagtcattt gcatttctct  
12001 gagcctgaat ttcatccaaa aagttaaagg agtatattag tctcttggtt ccaaactcaa  
12061 gactaatgga tacacattag aaatacatgg gaagcttggt taaaatgcaa atgctctgag  
12121 tcctaaacta ggaaaaagca gttcagtagg ttttaggggt tgtgttttaa atatgtgctc  
12181 tataatcata cagaatctat atgattggtt gtaattgatg tgattatgat taatcctttc  
12241 ttagtaagat atgcaggatt tcctatctta ctagaaatta gtatctttct gggtcacatt  
12301 tatttacta attctccagt tccttttttt ttttctttt tttttgagat ggagtcttgc  
12361 tctgtcgcca ggctggagtg cagtgatgcg atcttgactc actgcaacct ctgcctcctg  
12421 ggttcaagcg attcttctgc ctccagcctcc cgagtagctg ggactacagg ctcccgccac  
12481 cagccccgc taattttttt ttttttgat ttagtagag ttggggtttc actgtgttgg  
12541 ccaggatgct ctccatctcc tgacctcatg atccaccac ctccagcctcc caaagggctg  
12601 ggattacagg cgttagccac ctgccttggc cctttagttc tttttatctt aaactcctct  
12661 cataaattac atgtgcttga atcataattt cccagccttt gttccttgca ttctgattct  
12721 ctaagctcta agtttttttt ttttctcttt ggcatacctc tgtaagtctc tttaaaaatg  
12781 accatcaggg ctgggcgcgg tggctcacac ctgtaatccc agcactttgg gaggctgagg

C7453T

C7624T

# ANHANG

12841	cgggcggtac	acgaggtcag	gagatcaaga	ccattctggc	taacacggtg	aaaccccgctc	
12901	tttactaaaa	aaaatacaaa	aaaattagcc	aggtgtggtg	gcgggcgcct	gtagtccag	
12961	ctactcagga	ggctgaggca	ggagaatggg	gtgaacccaa	gaggcagagc	ttgcagttag	
13021	cggagatggc	accactgcag	tccagcctgg	gcgacagagc	aagactccgt	ctcaaaaaaa	
13081	aaaaaatgac	catcaggacc	gggcatagtg	gtcacatct	gtaaccccag	catttttttt	
13141	ttttgtgatg	gagtctcacc	ctgtcaccta	ggctggagtg	cgatgctgtg	atcttggtct	
13201	actgcaacct	ccacctccca	ggttcaaattg	attctcctgc	ctcaacctcc	tgagtagctg	
13261	ggattatagg	cgcctgccac	cacgccttgc	taatttttgt	atttttagta	gagacggggt	
13321	ttcaccatat	tggccaggct	ggactcaaac	tcttgacctc	gtgatccgcc	cacctcggcc	
13381	tcccaaagtg	ctgggattac	aggcgtgagc	caccgtgccc	agccacaatc	ccagcatttt	
13441	gaatggccaa	gacaggagga	tcacttgagc	ccaggagtgt	cagaccagcc	tgggcaacat	
13501	cgtgaagacc	catctcaaaa	aaacaaaaat	tagcaggggtg	tgggtggcaag	tgctgttagt	
13561	cccagctgct	tagtaggctg	aggtgggagg	atcgcttggg	cctgagaggg	caaggggtgtc	
13621	cagtctgggc	aacaaaacaa	gtcccagtct	cagaaaaaaa	agttgaccct	tagctcattg	
13681	ttgatgagat	tagattacct	taaaaataac	cttaaaaaat	cattcccggg	gaggcgcgga	T11638C
13741	gggagcactt	tgggaggcca	agggtcgtgg	atctcgaggt	caggagatcg	aggcaaggct	C11697G
13801	tttctaggat	gctcactgtt	taatcagaat	ttttcaacca	taattggaaa	taaatttgtc	T11750G
13861	aaccataatt	ggaaattaaa	attgaattgc	aatattcaga	ttttcaatat	gcttcatttt	
13921	tttaaagtca	aataatgaca	ttaaagggtt	attttatttt	ctagaagaat	caaaagaacc	
13981	tgttgctgat	gaagaagagg	aagacagtga	tgatgatgtt	gaacctatta	ctgaatttag	
14041	atttgtgcct	agtgtataat	cagcgtgtga	gtgttctaca	gtattgattc	ttcccctttt	
14101	acataccaag	cattcccaat	tgacacacac	acacatacac	acacacacac	acctctcacc	
14161	tttaccacca	ttacctccat	tctattgctt	tttctttatt	ttagcattgg	taatatacatt	
14221	aaggaccaa	tacctattaa	tatcaaagg	tgtgaatgta	gtgagaatat	tgtagacact	
14281	ctgtcatctg	ggtatatttt	gtgagtggac	tctggttagt	tttactgatt	ggtgctgttg	
14341	acttaatctc	acctgctgga	tggcagagga	gttatggcag	ttttaaagtg	gaagatctca	
14401	ggatggctgg	aaagagccct	atcagctgag	agcagctctc	acccttcacc	ctgatgccag	
14461	cagctcttacc	aggactctga	cccctttttc	ttggaaaatc	ccacgagcca	tgaagagatt	
14521	gcaatgatct	ctcataatga	actcttatta	ttttatgact	tgtcttttgc	ttcaaccgct	
14581	ttcaagattg	atcttacaat	ttggcagatt	ttgtaaatac	tgtggcggtt	tgtgtaccca	
14641	ttaaatttat	ttgcaactgat	ggttactttt	attacaaaaa	aagattgggt	acagtttaatt	
14701	ttccttggtc	agtggaggca	atgttcaactg	caatgtgcga	atgccaggcc	ttgcatccag	
14761	atcctgagga	tgaggattca	gatgactacg	atggagaaga	atatgatgtg	gaagcacatg	
14821	gttagtgaaa	tggattttta	agtgggtttt	ttgtttgttt	agtgtttcat	tttaagcatt	T12777G
14881	tatttgtatt	aagggttagag	gattatagtt	cttttatatga	ctgtaaagta	tgcagtatgg	
14941	taaaattatt	attattattt	ttgagatgga	gttttcgctt	ttgttgccca	ggctggagtg	Dele12888AT1
15001	caatggcgtg	gtctcggctc	actgcaacct	ctgcctccta	ggttcaagcg	attctcctgc	
15061	ctcagccttc	caagtagctg	ggattacagg	catgcgccac	cacgccaggc	taattttgta	
15121	tttttagtag	agatgggggt	tctccatgtt	ggtcaggctg	gtcttgaact	cccgcacctc	
15181	ggtgatccgc	ctgcctcggc	ctcccaagt	gctgggatta	cagggtgtgag	ccactgtgcc	
15241	tggctggtaa	gattattatt	aaaatagaat	gacacggtag	aacactttat	gccaaagccc	
15301	tttgcaacag	acaaattttt	gagtgtaaaga	aatagagatt	gttatgggga	agaatgggta	
15361	agtagagcat	atgggaggaa	agaaaatgg	agatagggaa	gtggatggtc	aggaaagtct	
15421	tttaagctga	ggcagctgcc	cccagagaac	aagcttctct	ctctacacct	tgagaacctg	
15481	gatcatttat	attgttttat	tattactatt	attattttgc	aacagggctc	cactctgatg	
15541	cccaggctgg	tgtgcagtgg	tgtgattttc	gctcactgca	acctctgcct	ctggagctca	
15601	aatgattctc	ccagctcagc	ctcttgagta	cctgggacta	caggcttgcg	ccaccatgcc	
15661	tggctaattt	ttgtgtattt	tttataaaga	ctgggctttg	ccatattgcc	caagctgggtc	
15721	tccaactcct	gggcccagc	aatcctctgg	ccttggcctc	ccagaatgct	gggttacagg	
15781	catgagccac	cgggcctggc	ctgcatcttt	atttaacatg	ttccttcaaa	cagctcactg	
15841	ccaaggctcat	ttctttttct	cagaaccata	cttcatttat	ttaagagccc	tttccgattg	
15901	cctccccag	accagaatgc	agtcactagc	gtgataagag	tctttatagc	ttgaagtacc	
15961	tgctgtttct	ttttcttttc	cctactgggt	ttatgtacac	caatctgggt	atccaaagcc	
16021	ctttccttca	tatgtaccca	cttctgggtc	tgagataaac	acatttctgg	gatccgccat	
16081	cacataccta	aatatatcca	aatatatcct	tatctttctg	agatttttga	gtgatttaaa	
16141	atttttcatc	ctttttgtat	gttccagaat	ttctaatttt	tttttttttt	ttaaacaggg	
16201	tctaactctg	ttgcccaggc	tgggaatacag	tggtagcatt	ctccacccac	tgcagccttg	
16261	aactactgga	ccaaagctgt	cccaccccag	tctcccagat	agctgagact	acaggtgcac	
16321	accacgtgcc	cggctaatta	aaaaaaaacat	ttttttggag	agatgaagtc	ttactatggt	
16381	gtccaggctg	atcttgaact	cctggggtca	agcagtcctc	ccagctcggc	ctctcaaagt	
16441	gctgggatta	caaacgtcag	ccactgcacc	tggccctgat	tttttttaag	aaaggagcat	
16501	gttttttaat	cagaaaacat	cttcatttta	caaattaata	ccaaattaat	ttgtgctcac	
16561	ttgtaaaatt	cccacctcag	gataatgtag	gactctctga	ccttaggaac	acactttttt	

# ANHANG

16621	tttctagtc	ctggacttgg	gattccttgg	gaattgctgt	ttactggcct	gttatctctt	
16681	ttaataaccc	tagagagtag	gtacatcttc	tttgtatttc	tgtcttcagc	agtagcctat	
16741	atgtgtgtat	aaataaatgt	tcaaaagtat	cttcctggaa	gcctatttgg	acagtatatt	GI4676T
16801	atcttcagca	gattcctttt	tttttttttt	tttccaagac	aaggctctgc	tcgggttgccc	
16861	aggctggagt	acaatggcgt	gatctcgggt	cactgcaacc	tccacctctg	tgggttcaagc	
16921	gattctcctg	cctcagcctc	ctgagtagct	gggacaacag	gcgcgtgcca	ccacgcctgg	
16981	ctaatttttg	tatttttagt	agagataggg	tttcaccatg	ttggccaggc	tggcggcaga	
17041	tatattattg	attccatttt	gttttttcta	attgttgtat	ttaaacttta	aagttttctg	
17101	tttggattta	gaacaaggacag	gggcatcc	ctacatttta	cacctatgaa	gaaggattat	
17161	cccatctaac	acgagaaggc	caagccacac	tggagagatt	agaaggaatg	ctttctcagt	
17221	ctgtgagcag	ccagtataat	atggctgggg	tcaggacaga	agattcaata	agagattatg	
17281	aagggtgagt	tccttttgca	gtgtgaacag	tcagatgagc	acttgggcaa	taagttatgg	
17341	atagtcaata	gaagttcttt	taataactaa	gagaaagaat	tgactctcta	tagtatagga	
17401	agcagataca	gaattacata	gtataggaat	gcttatgtca	tttgttttta	gtgatttttt	Dele15333G
17461	ttcctcatta	ccaaaaaagt	ctttgttcat	agtcaaaaaa	atttttttaa	tgtgcgcaag	T15434G
17521	aaagtagaag	tgaaaaagaa	acaagtgtaa	ttctaactga	gagatatcca	ctattaattt	
17581	actgttgcat	ctgtgtatta	gtttgctagg	gctattataa	caaagtgtca	tacaggctgg	
17641	gtggctcaaa	caatagaatt	ttattgtctc	atagtttttg	aggctagaag	tcacgatag	
17701	gttatctctg	agggctgtca	attcaggcat	ctcttcagg	atacacacac	ccaccaaaagc	
17761	aagagagaga	ttttaagaaa	ttggccca	cg tgactgaagg	ctggc	aagtc	caaaatctgc
17821	atggtaagcc	ggcagactgg	agaccagag	aagagtttat	gttgcaattct	gctgcctcag	
17881	aagttctgct	ggcagaattt	cttcttgctc	aggggaggtg	agtctttttc	ctattgaggc	
17941	ctccagctga	ttaaatgaga	cccaccacac	tatgcagggt	aatctccttc	acccaatttt	
18001	caccagttta	caaggcta	ctcatctaaa	aaataacctc	cacagaaaca	tctagaataa	
18061	tgtttgacca	actatctgga	caccattgcc	tagccaagtt	gatgcataaa	tttaactatc	
18121	acacccttct	ttttttctta	agatggagtt	tcgctcttgt	tgccgaggct	ggagtgc	
18181	ggcacgatct	tggtcacta	caacctccgc	ctcctgggtt	caagcgattc	tcctgcctca	
18241	gcctctgaa	tagctggggt	actggcgctc	gccaccgctc	ccagctaatt	ttgtattttt	
18301	tagtagagac	aaggttccac	catgttggct	taaagtatgc	acaggcaaa	aagaggtaga	
18361	aaaaataaaa	tataattctg	agatgcattt	actattaatt	ttctgttgca	tatcctttca	
18421	gtcttgtgtc	cttttgtgtg	tgtatataca	ctgatttgtg	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	
18481	gtgtgtgttt	gagacagagt	cttgcctctg	cgtccaggcc	ggagtacaat	aacgtgacct	
18541	cggcttactg	caacctctgc	ctcccagggt	caagtgatcc	tcccacctca	gcctcctgag	
18601	tagcagggat	taccactac	tatcgtgccc	agctaatttt	tgtatttttg	tagagacggg	
18661	gtttcaccat	gttggccagg	ctggtctcga	actcctgacc	tcagggtgatc	cgcccgctc	
18721	agcctcccaa	agtattggga	ttacaggcgt	gagccactgc	accgggcat	gattctgtct	
18781	tatttatatta	tttatttatt	taagacggag	tctcactctg	ttggccaggc	tggagtgcag	
18841	tggcatgatc	ttggcttact	tcaacctcca	cctcctgggt	ttaaagagatt	cttctgcctc	
18901	agcctcctga	gtagttggga	ttacaggcat	gtgccaccat	gcctgggctaa	tttttgtatt	
18961	tttagtagag	gcgggggttt	accatgttgg	ccaggctgggt	ctctaactcc	tgacctcagg	
19021	tgatctgcct	gccttggcct	ccaccttcc	ggttcaagcc	attctcctgc	ctcagcctcc	
19081	cgagtagctg	ggattataag	cgctgccc	catgcccggg	taattttttt	gtatttttgt	
19141	tagagatttc	gccatggggt	tttgccatgt	tggccaggct	ggtctcaaac	tcctgacctc	
19201	aggtgatcca	cccaccttgg	cctcccaag	tgctgggatt	acaggcggtga	gccactgtgc	
19261	ctggccaaga	caactcttcc	cgtggggcct	gtattagtct	gttttcacac	tgctgataaa	
19321	gacatactca	agactgggca	attagcaaaa	gaaagagggt	tcattggact	tcagttcca	
19381	tatggctggg	gaaacctcac	aatcgtgggt	gaagacgagg	agcaaatcac	atcttacatg	
19441	gaaggcagca	agcaaaaaga	gcttttgcag	gaaaactccc	ccttatataa	ccatcagatc	
19501	tagtgaaact	tactcattat	tatgagaaca	gcacgggaaa	gacctgcccc	cataat	tcag
19561	ttacctccca	ccagatccct	cccacaacac	gtgggaattc	aagatgaaat	ttgggtaggg	
19621	acacagccaa	accatatcag	ggctcttgtt	ttttttctct	tgttccctcc	ccacctttta	
19681	tttaatgaga	tgacaaaaac	agggaaataa	gcaaaaagct	tgctgtactg	atttttgtct	
19741	tttcactttg	tgaggatagg	gctgtatacc	ttaaaaagcc	taacagtaaa	tacttagatc	
19801	tgtaaagggt	gaacaattga	tactgcattt	gaaagttcct	acatagagtt	atttttagtat	
19861	tgagggtgag	aatttacaca	gttagtgtcg	cagactgatt	ttgatgtggc	ctaaatcccc	
19921	aggtagcatt	ttcttttctca	gtttgtccct	tcagactttt	ccaaaaagag	gaaaaagcaa	
19981	ttcttaccag	cagagggcac	tagcttccct	ctggtagaag	ttataagttg	aatctacctg	
20041	tctgaagtgt	tcatagggat	tgctcagtaa	tttaattttt	tggttagatg	ggatggagggt	T18012G
20101	ggataaccaca	ccaacagttg	ctggacagtt	tgaggatgca	gatgttgatc	actgaaaatg	
20161	atttatgcaa	gtttaaggtg	agtagttcat	tttctccctt	gtcgtgatc	atgaaaatca	
20221	tatgaaatga	ttacttttcta	cttttttaaa	ttctttcttg	agacagggtc	ttactctgtc	
20281	accaggcta	gagtgcagtg	gcatgatcct	agctcactac	agccttgaac	tcaagcaatc	
20341	cacctgcctc	accctcccaa	atagctggga	ctataggc	atgcttacca	cacc	Dele18317T

# ANHANG

20401	atttttaaaat	tttacgtaga	gacaagggtct	cacatggttg	ccaggctggt	ctctaactcc	
20461	tggcctcaaa	tgattctccc	tcctcggcat	ccgaaagtag	tgggattaca	gctgtgagcc	
20521	actgtatctg	gcctattttct	ttttccttct	ttaaaaaaat	ttttccttct	ttaaaccctca	
20581	gattgttcct	gacaatttat	ttgctactcc	attattctga	gaaatatatt	gtcctttgcc	
20641	agcctaagta	tttcaactat	atggttagata	ataactgaag	gtcatgttca	tatcatcacag	
20701	agctagaacc	agtaattgta	gtagtccctt	ataagctgtt	gttaaat	ttgt	tgtccctgtc
20761	tccc	cactac	aacttcctcc	taccttatag	cattgttttc	ttgaatactg	gctatcctcc
20821	agtctttgag	atgctctcgc	tagcctcctt	ttattttact	aaagcatata	gtaatagcat	
20881	ggtaagattt	atatgttttg	acttgactct	gctaccactg	tcagtcaccc	agttaagtta	
20941	taagatccct	tgttattccc	tgcaatgata	aatatttcag	aattccttct	cttttcttct	
21001	gatacacagt	ttagttctga	acctagtctt	gtaatcattg	gcttttctcc	agttacaagt	
21061	tttaattcct	ttaccctgt	tctatttcat	ttcagaaacc	agccttttaa	agttccagtt	
21121	agcttccaag	ttactgctat	tgtgaaaact	gtataacatt	gcttcttata	ctgaccatga	
21181	attgtgatac	tggacctgtg	ctttcttctc	acatcctgcc	agtggaaacta	tcagaaaaata	
21241	acctcttaga	gttctatgat	ttatattttc	ccttaaatac	ttaattttaa	tttccacatt	
21301	tacttttgct	agtggtagcc	atacagttta	aaattagcaa	tgtcttctct	gttaaaatca	
21361	tgtgttcaca	tcactggagc	tctgttaact	ttgattttta	gctctcacag	ttccaattgt	
21421	cagtaacttc	actgttctac	ttcatgggaa	atcctttgat	atcaacttca	gtattctttc	
21481	cttattttctc	atcacattat	agcatattaa	ttttttcagt	tcagtgatac	ttgttttagt	
21541	aactgtttta	ttgcaattag	aaaacagatt	tttgggtctt	tgggctttca	catatttctt	
21601	ttgaagaata	gactatacac	agaacatcag	ccactctatt	attaatcaga	atcatgagaa	
21661	actcatttgg	tatgtcacta	acagttaaac	aaatgggatg	ttactgcagt	ccttggcaag	
21721	aattcttagg	attcttttta	atggtgaaat	agccacaaac	tttttaataga	gctttgtttt	
21781	ctgttaattt	tatcctagag	ctcagaggca	gagaattatt	ttattcataa	cggttttttt	
21841	tcttttcttt	tttttttttc	tttttgagat	ggaaatctcg	tctgtcgcgc	aagctggagt	
21901	gcagtgggtg	gatcctgggt	cactgcaacc	tctgtctcct	gggttcaagc	gattctcctg	
21961	cttcagtcct	ccaagtagct	ggaactacag	acgcgcgcga	ccacgcctgg	ctaatttttg	
22021	tatttttagt	agagagaggg	tttcaccatg	ttggccagga	tggctctgat	cttttgacct	
22081	cgtgatccgc	ctgcctcggc	ctctcaaagt	gctgggatta	caggcatgag	ccactgcacc	
22141	ctgtttataa	tgtataaaca	ttatgtataa	tgtttataca	tattcttcat	ctggataatt	
22201	gatctgaatt	ccgaacaatg	tctgtacatt	tttttttttt	tgacacggga	gtctcgcctc	
22261	gttgccctagg	ctgggtgtgca	gtggcgcaac	ttgggttcatt	gcaacctctg	cctcccgggt	
22321	tcaagcaatt	ctcctgcctc	agcctcctga	atagctggga	ttacaggtgc	ccaccaccac	
22381	acccggctaa	tttttttttt	tttttttttt	tttttgagat	ggagtttcgc	tctgttgcc	
22441	caggctggag	tgcaatgggt	caatcggtc	accgaatcct	ccgccccccc	gggttcaagt	
22501	gattctcctg	cctcatcctc	ccgagtagct	gggattacag	gc	atgtgcca	ccacgcctg
22561	ctaattttgt	aatttttagta	gagacagtgt	ttctccatgt	ttggtaaggc	tggctctgaa	
22621	cttctgacct	cagggttatcc	gcctgccttg	gcctcccaaa	gtgctgggat	tacagggtgtg	
22681	agccaccaca	cctggctgtg	taaattttta	atcattttaa	attgtacatg	ctttaaaaga	
22741	atgaataagg	aataaataat	taagagtagt	ttatgcaact	gttaataatt	tcaggataat	
22801	ggaactagga	cttctcagtg	catgaggtgg	gggtggagacg	gcacgttaat	cgtggaatca	
22861	caactctgcc	acatacttgt	gtacacctt	ggacaaggca	tataacttat	ttaatcctca	
22921	cttcccc	cat	ctgtaaaatg	gggagg	tataa	tacctacctt	gcagggttgt
22981	aagataaaa	gtacctaggt	cctctggcac	tcgtgactag	gc	at	tcaata
23041	attattatta	tcactactgt	aaacactgta	aaccttttgt	ttttcagatt	ctgctcctaa	
23101	gtgtaggaga	gaacttgggt	ctctctccac	ctcggagtga	agttaatgaa	agtccttttc	
23161	cttttccaaa	acccaacctg	aaccagttct	ttcttgagac	agactatact	gagacaacaa	
23221	gttgtcacca	gcagaagata	gataatatga	cctttattaa	cttgatgaat	taacttaacc	
23281	aagaggggat	ttgtagttaa	ctattttacc	taaaactttc	tgtgtctggg	tacctcttga	
23341	gtaggcctat	aattcctacc	ttgactgtgt	gc	atcattttg	taagctagca	gatctatgtg
23401	gtgaaaatgc	acaggagctt	ggtagactgc	gggggaaaga	gaga	gctcct	ttcgccatgt
23461	tttaccagtc	tgctgttata	acctcttagg	ttgtatcctt	taattttccag	ccttttaggt	
23521	tagtttctgt	aacagaacaa	gtgagtctgg	gatgaagtcc	tcaaagtact	tcaaatggta	
23581	attgttttgt	ttttgtaata	gcttaacaaa	taaacctagg	ttttctatat	tactttgctc	
23641	tcattcttga	ctaaaaccat	taatgagaaa	tgttttttaa	aaa	ataatgc	tggcaaatat
23701	gaga	aatttttg	ttggctttat	ttttgtttac	ttgttgagaa	gatgaacatg	aaattaataa
23761	gaaaatatag	ttatagcttc	tggcaagtat	ttagtaaggc	aaagatttaa	cacattttag	
23821	gggattttctg	ccacttc	cctt	ttagatcagc	agtaatttct	tatatattatc	aactctcaat
23881	ttttagtttt	catagatacc	tgggtattat	aaggctgatt	tgttaattact	gattttatact	
23941	tggacttttg	aaatcattat	gtgtccttaa	aaataagggt	atacaagcta	accttcttaa	
24001	caggatcaca	tggctaatta	gtgactaaac	tgatgtttg	g	taccactcag	cccagtgttc
24061	atttcagcac	tgtcacttgg	tttcctttat	ccttgcaagg	agactgaaaa	aaaacgaatt	
24121	ttc	ctttttc	taaccagact	ctcag	aattt	ctgagtcgtg	taacaatagg
							caagtaaaac

T21391A

Dele21615A

G21970A

```

24181 agccacttga aatggaaact aaaatttact gagacctctg tactagccac tgtcctgagt
24241 tctttattat gtattataat attcttaatt atcttatgag atacgctttt atcccacttt
24301 atagttgagg aaactgagtt atagagagag gtaaaataac ttgcttaagg tcatgtagat
24361 agtgaattgt gattttttgag cctgtgcttt aaaacatcat acagccttac cacctaccag
24421 cagcagaaaag catgcacact ctccccactg ctgcaggggtt tcagtgttaa catttcaatg
24481 gccagtacaa gagcttcccc agttttctctg ctacccatct gagcaacacc cataattcta
24541 tcctagaagt ttgtccattc ttcagtaatc agtcaggaca ttctcacagg ctaatattag
24601 aaattccatt tgagttcctt ttaaaaggaa caaatttata attgtgactt tccatgaaca
24661 taaattgctc tgatagcaaa atgtcgagaa gattcagagt gtacttggtt tcttgttggt
//

```

**Red** = Exon

**Yellow** = Sequence variations

**Green** = Forward primer

**Blue** = Reverse primer

Stand: 09.4.2006



## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Alton, E. and A. Norris (1996). "Chloride transport and actions of nedocromilsodium and cromolyn sodium in asthma." J Allergy Clin Immunol **98**: 102-106.
- Arima, K., R. Umeshita, Y. Sakata, M. Akaiwa, X. Mao, T. Enomoto, Y. Dake, S. Shimazu, T. Yamashita, N. Sugawara, S. Brodeur, R. Geha, R. Puri, M. Sayegh, C. Adra, N. Hamasaki, J. Hopkin, T. Shirakawa and K. Izuhara (2002). "Upregulation of IL-13 concentration in vivo by the IL13 variant associated with bronchial asthma." J Allergy Clin Immunol **109**: 980-987.
- Atsuta, J., S. Sterbinsky, L. Schwiebert, B. Bochner and R. Schleimer (1997). "Phenotyping and cytokine regulation of the BEAS-2B human bronchial epithelia cell: demonstration of inducible expression of the adhesion molecule VCAM-1 and ICAM-1." Am J Respir Cell Mol Biol **17**: 571-582.
- Baldini, M., P. Graves, R. Erickson and F. Martinez (1998). "Lack of association between a polymorphism of the CC16 gene and increased susceptibility of asthma. (abstract)." Am J Respir Crit Care Med **157**: A771.
- Barrett, J. (2005). "Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps." Bioinformatics **21**: 263-265.
- Basehore, M., T. Howard, L. Lange, W. Moore, G. Hawkins, P. Marshik, M. Harkins, D. Meyers and E. Bleecker (2004). "A comprehensive Evaluation of IL4 variant in ethnically diverse populations: Association of total IgE levels and asthma in white subjects." J Allergy Clin Immunol **114**: 80-87.
- Bentley, A., S. Durham, D. Robinson, G. Menz, C. Storz, O. Cromwell, A. Kay and A. Wardlaw (1993). "Expression of endothelial and leukocyte adhesion molecules intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, and vascular cell adhesion molecule-1 in the bronchial mucosa in steady-state and allergen-induced asthma." J Allergy Clin Immunol **92**: 857-868.
- Berg, T., T. Cassel, P. Schwartze and M. Nord (2002). "Glucocorticoids regulate the CCSP and CYP2B1 promoters via C/EBPbeta and delta in lung cels." Biochem Biophys Res Commun **293**: 907-12.
- Bernard, A., F. Marchandise, S. Depelchin, R. Lauwerys and Y. Sibille (1992). "Clara cell protein in serum and bronchoalveolar lavage." Eur Respir J **5**: 1231-8.
- Black, R. and W. JM (1998). "ADAMs: focus on the protease domain." Curr Opin Cell Biol **10**: 654-659.
- Blakey, J., E. Halapi, U. Bjornsdottir, A. Wheatley, S. Kristinsson, R. Upmanyu, K. Stefansson, H. Hakonarson and I. Hall (2005). "Contribution of ADAM33 polymorphisms to the population risk of asthma." Thorax **60**: 263-4.
- Bond, T., S. Basavappa, M. Christensen and K. Strange (1999). "ATP dependence of the ICl<sub>1</sub> swell channel varies with rate of cell swelling." J Gen Physiol **113**: 441-456.

- Broeckaert, F. and A. Bernard (2000). "Clara cell secretory protein (CC16): characteristics and perspectives as lung peripheral biomarker." Clin Exp Allergy **30**: 469-75.
- Candelaria, P., V. Backer, I. Laing, C. Porsbjerg, S. Nepper-Christensen, N. de Klerk, J. Goldblatt and P. le Souef (2005). "Association between asthma-related phenotypes and the CC16 A38G polymorphism in an unselected population of young adult Danes." Immunogenetics **57**: 25-32.
- Chen, L., Z. Zhang, A. Myers and S. Huang (2001). "Cutting edge: altered pulmonary eosinophilic inflammation in mice deficient for Clara cell secretory 10-kDa protein." J Immunol **167**: 3025-8.
- Davies, D., J. Wicks, R. Powell, S. Puddicombe and S. Holgate (2003). "Airway remodeling in asthma: New insights." J Allergy Clin Immunol **111**: 215-225.
- Deutsche Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAI), Ä. d. A. Ä. and D. A. f. A. u. U. (DAAU) (2004). Weißbuch Allergie in Deutschland.
- Dierynck, I., A. Bernard, H. Roels and M. De Ley (1995). "Potent inhibition of both human interferon-gamma production and biologic activity by the Clara cell protein CC16." Am J Respir Cell Mol Biol **12**: 205-10.
- Ding, C. and C. Cantor (2003). "A high-throughput gene expression analysis technique using competitive PCR and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight MS." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**: 3059-64.
- Duffy, D., N. Martin, D. Battistutta, J. Hopper and J. Mathews (1990). "Genetics of asthma and hayfever in Australian twins." Eur Respir J **142**: 1351-8.
- Dworkin, P. (2000). Pediatrics.
- Emma, F., S. Breton, R. Morrison, S. Wright and K. Strange (1998a). "Effect of swelling on membrane and cytoplasmic distribution of pICln." Am J Physiol **274**: 1545-1551.
- Emma, F., R. Sanchez-Olea and K. Strange (1998b). "Characterization of pI(Cln) binding proteins: identification of p17 and assessment of the role of acidic domains in mediating protein-protein interactions." Biochimica et Biophysica Acta **1404**: 321-328.
- Fauci, A., E. Braunwald, K. Isselbacher, J. Wilson, J. Martin, D. Kasper, S. Hauser and D. Longo (1999). Harrisons Internal Medicine.
- Fedorova, L. and A. Fedorov (2003). "Introns in gene evolution." Genetica **118**: 123-131.
- Feijen, M., J. Gerritsen and D. S. Postma (2000). "Genetics of allergic disease." British Medical Bulletin **56**: 894-907.
- Fürst, J., C. Bazzini, M. Jakab, G. Meyer, M. König, M. Gschwentner, M. Ritter, A. Schmarda, G. Botta, R. Benz, P. Deetjen and M. Paulmichl (2000a). "Functional reconstitution of ICln in lipid belayers." Pflugers Arch. **440**: 100-115.

- Fürst, J., M. Gschwentner, M. Ritter, G. Botta, M. Jakab, M. Mayer, L. Garavaglia, C. Bazzini, S. Rodighiero, G. Meyer, S. Eichmüller, E. Wöll and M. Paulmichl (2002). "Molecular and functional aspects of anionic channels activated during volume decrease in mammalian cells." Pflugers Arch.Eur. J. Physiol. **444**: 1-25.
- Fürst, J., M. Jakab, M. König, M. Ritter, M. Gschwentner, J. Rudzki, J. Danzl, M. Mayer, C. Burtscher, J. Schirmer, B. Maier, M. Nairz, S. Chwatal and M. Paulmichl (2000b). "Structure and function of the ion channel ICln." Cell Physiol Biochem **10**: 329-334.
- Gao, P., X. Mao, M. Kawai, T. Enomoto, S. Sasaki, O. Tanabe, K. Yoshimura, S. Shaldon, Y. Dake, H. Kitano, P. Coull, T. Shirakawa and J. Hopkin (1998). "Negative association between asthma and variants of CC16(CC10) on chromosome 11q13 in British and Japanese populations." Hum Genet **103**: 57-59.
- Garavaglia, L., S. Rodighiero, C. Bertocchi, R. Manfredi, J. Fürst, M. Gschwentner, M. Ritter, C. Bazzini, G. Botta, M. Jakab, G. Meyer and M. Paulmichl (2002). "ICln channels reconstituted in heart-lipid bilayer are selektive to chloride." Pflugers Arch. **443**: 748-753.
- Glanville, A., H. Tazelaar and J. Theodore (1989). "The distribution of MHC class I and II antigens on bronchial epithelium." Am Rev Respir Dis **139**: 330-334.
- Glimbacher, B. (1998). "The interleukin-4 receptor variant Q576R in hyper-IgE syndrome." New England Journal of Medicine **338**: 1073-1074.
- Graber, P., D. Gretener, S. Herren, J. Aubry, G. Elson, J. Poudrier, S. Lecoanet-Henchoz, S. Alouani, C. Losberger, J. Bonnefoy, M. Kosco-Vilbois and J. Gauchat (1998). "The distribution of IL-13 receptor alpha1 expression on B cells, T cells and monocytes and its regulation by IL-13 and IL-4." Eur J Immunol **28**: 4286-4298.
- Graves, P., M. Kabesch, M. Halonen, C. Holberg, M. Baldini, C. Fritzsche, S. K. Weiland, R. Erickson and E. Von Mutius (2000). "A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children." J Allergy Clin Immunol **105**: 506-513.
- Grevers, G. and M. Röcken (2001). Taschenatlas der Allergologie.
- Griffin, T. and L. Smith (2000). "Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry." Trends Biotechnol **18**: 77-84.
- Grünig, G., M. Warnock, A. Wakil, R. Venkayya, F. Brombacher, D. Rennick, D. Sheppard, M. Mohrs, D. Donaldson, R. Locksley and D. Corry (1998). "Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma." Science **282**: 2261-2263.
- Gschwentner, M., A. Jungwirth, S. Hofer, E. Woll, M. Ritter, A. Susanna, A. Schmarda, G. Reibnegger, G. Pinggera, M. Leitinger, J. Frick, P. Deetjen and M. Paulmichl (1996a). "Blockade of swelling-induced chloride channels by phenol derivatives." Br J Pharmacol **118**: 41-48.
- Gschwentner, M., U. Nagl, E. Woll, A. Schmarda, M. Ritter and M. Paulmichl (1995a). "Antisense oligonucleotides suppress cell-volume-induced activation of chloride channels." Pflugers Arch. **430**: 464-470.

Gschwentner, M., A. Susanna, A. Schmarda, A. Laich, U. Nagl, H. Ellemunter, P. Deetjen, J. Frick and M. Paulmichl (1996b). "ICLN: a chloride channel paramount for cell volume regulation." J Allergy Clin Immunol **98**: 98-101.

Gschwentner, M., A. Susanna, E. Wöll, M. Ritter, U. Nagl, A. Schmarda, A. Laich, G. Pinggera, H. Ellemunter, H. Huemer, P. Deetjen and M. Paulmichl (1995b). "Antiviral drugs from the nucleoside analog family block volume-activated chloride channels." Mol Med **1**: 407-417.

Hartl, D. and A. Clark (1997). Principles of population genetics.

Hartmer, R., N. Storm, S. Boecker, C. Rodi, F. Hillenkamp, C. Jurinke and V. d. BD (2003). "RNase T1 mediated base-specific cleavage and MALDI-TOF MS for high-throughput comparative sequence analysis." Nucleic Acid Res **31**(1-10).

Heinzmann, A., X. Mao, M. Akaiwa, R. Kreomer, P. Gao, K. Ohshima, R. Umeshita, Y. Abe, S. Braun, T. Yamashita, M. Roberts, R. Sugimoto, K. Arima, Y. Arinobu, B. Yu, S. Kruse, T. Enomoto, Y. Dake, M. Kawai, S. Shimazu, S. Sasaki, C. Adra, M. Kitaichi, H. Inoue, K. Yamauchi, N. Tomichi, F. Kurimoto, N. Hamasaki, J. Hopkin, K. Izuhara, T. Shirakawa and K. Deichmann (2000). "Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy." Hum Mol Genet **9**: 549-559.

Hershey, G., M. Friedrich, L. Esswein, M. Thomas and T. Chatila (1997). "The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4-receptor." New England Journal of Medicine **337**: 1720-1725.

Hilgemann, D. (1997). "Cytoplasmatic ATP-dependent regulation of ion transporters and channels: mechanisms and messengers." Annu. Rev. Physiol **59**: 193-220.

Hilton, D., J. Zhang, D. Metcalf, W. Alexander, N. Nicola and T. Willson (1996). "Cloning and characterization of a binding subunit of the interleukin 13 receptor that is also a component of the interleukin 4 receptor." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 497-501.

Hoffjan, S., D. Nicolae, I. Ostrovnya, K. Roberg, M. Evans, D. Mirel, L. Steiner, K. Walker, P. Shult, R. Gangnon, J. Gern, F. Martinez, R. Lemanske and C. Ober (2005). "Gene-Environment Interaction Effects on the Development of Immune Response in the 1st Year of Life." Am. J. Hum. Genet. **76**: 696-704.

Hogan, S., K. Mattheai, J. Young, A. Koskinen, I. Young and P. Foster (1998). "A novel T cell-regulated mechanism modulating allergen-induced airways hyperreactivity in BALB/c mice independently of IL-4 and IL-5." J Immunol **161**: 1501-1509.

Holgate, S. (1999). "Genetic and environmental interaction in allergy and asthma." J Allergy Clin Immunol **104**: 1139-46.

Holgate, S., D. Davies, G. Murphy, R. Powell and J. Holloway (2003). "ADAM33: just another asthma gene or a breakthrough in understanding the origins of bronchial hyperresponsiveness?" Thorax **58**: 466-469.

- Holgate, S., J. Holloway, S. Wilson, F. Bucchieri, S. Puddicombe and D. Davies (2004). "Epithelial-Mesenchymal Communication in the Pathogenesis of Chronic Asthma." Proc Am Thorac Soc **1**: 93-98.
- Holgate, S., P. Lackie, D. Davies, W. Roche and A. Walls (1999). "The bronchial epithelium as a key regulator of airway inflammation and remodelling in asthma." Clin Exp Allergy **29**: 90-95.
- Holt, P. and J. Upham (2004). "The role of dendritic cells in asthma." Curr Opin Allergy Clin Immunol **4**: 39-44.
- Howarth, P., A. Knox, Y. Amrani, O. Tliba, R. Panettieri and M. Johnson (2004). "Synthetic responses in airway smooth muscle." J Allergy Clin Immunol **114**: 32-50.
- Hubert, M., I. Levitan, M. Hoffmann, M. Zraggen, M. Hofreiter and S. Garber (2000). "Modulation of volume regulated anion current by ICln." Biochimica et Biophysica Acta **1466**: 105-114.
- ISAAC, S. C. (1998). "Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC." The Lancet **351**: 1225-1232.
- Johansson, S., C. Keen, A. Staahl, G. Wennergren and M. Benson (2005). "Low levels of CC16 in nasal fluid of children with birch pollen-induced rhinitis." Allergy **60**: 638-42.
- Johnston, C., G. Mango, J. Finkelstein and B. Stripp (1997). "Altered pulmonary response to hyperoxia in Clara cell secretory protein deficient mice." Am J Respir Cell Mol Biol **17**: 147-55.
- Jongepier, H., H. Boezen, A. Dijkstra, T. Howard, J. Vonk, G. Koppelman, S. Zheng, D. Meyers, E. Bleeker and D. S. Postma (2004). "Polymorphisms in the ADAM33 gene are associated with accelerated lung function decline in asthma." Clin Exp Allergy **34**: 757-760.
- Kabesch, M. (2001). "Asthma und Allergie; Genetische Prädisposition und Umweltfaktoren." Monatsschrift Kinderheilkunde **149**: 94-105.
- Kabesch, M. (2004). "Candidate genes and the genetic epidemiology of asthma." Paediatric Respiratory Reviews **5(Suppl A)**: 23-25.
- Kabesch, M., W. Peters, D. Carr, W. Leupold, S. K. Weiland and E. Von Mutius (2003a). "Association between polymorphisms in caspase recruitment domain containing protein 15 and allergy in two German populations." J Allergy Clin Immunol **111**: 813-817.
- Kabesch, M., I. Tzotcheva, D. Carr, C. Höfler, S. K. Weiland, C. Fritzsche, E. Von Mutius and F. Martinez (2003b). "A complete screening of the IL4 gene: novel polymorphisms and their association with asthma and IgE in childhood." J Allergy Clin Immunol **112**: 893-898.
- Kalb, T., M. Chuang, Z. Marom and L. Mayer (1991). "Evidence for accessory cell function by class II MHC antigen-expressing airway epithelial cells." Am J Respir Cell Mol Biol **4**: 320-329.

Karas, M., U. Bahr, A. Ingendoh, E. Nordhoff, B. Stahl, F. Strupat and F. Hillenkamp (1991). "Principles and applications of matrix-assisted UV-laser desorption/ionization mass spectrometry." Anal. Chim. Acta **241**: 151-53.

Karas, M. and F. Hillenkamp (1988). "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons." Anal. Chem. **60**: 2299-2301.

Kawakami, T., E. Nogucchi, T. Arimani, K. Yamakawa-Kobayashi, H. Nakagawa and F. Otsuka (1998). "Linkage and association of an interleukin 4 gene polymorphism with atopic dermatitis in Japanese families." J Med Genet **35**: 502-504.

Kay, A. (2000). "Overview of Allergy and allergic diseases: with a view ti the future." British Medical Bulletin **56**: 843-864.

Keller, A. and T. Maniatis (1991). "Identification and characterization of a novel repressor of beta-interferon gene expression." Genes Dev. **5**: 1566-1570.

Kelly-Welch, A., E. Hanson, M. Boothby and A. Keegan (2003). "Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps." Science **300**: 1527-1528.

Kerem, B., J. Rommens, J. Buchanan, D. Markiewicz, T. Cox, A. Chakravarti, M. Buchwald and L. Tsui (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis." Science **245**: 1073-1080.

Kim, Y., D. Kang, D. Kwon, W. Park, H. Kim, D. Lee, C. Lim, J. Han, S. Kim and J. Lee (2001). "Uteroglobin gene polymorphisms affect the progression of immunglobulin A nephrophathy by modulating the level of uteroglobin expression." Pharmacogenetics **11**: 299-305.

Kirpekar, F., E. Nordhoff, L. Larsen, K. Kristansen, P. Roepstorff and F. Hillenkamp (1998). "DNA sequence analysis by MALDI mass spetrometry." Nucleic Acid Res **26**: 2554-59.

Koletzko, B. (2004). Kinderheilkunde und Jugendmedizin.

Koppelman, G., H. Los and D. S. Postma (1999). "Genetics and environment in asthma: the answer of twin studies." Eur Respir J **13**: 2-4.

Kormann, M. S. D., D. Carr, N. Klopp, T. Illig, W. Leupold, C. Fritsch, S. K. Weiland, E. Von Mutius and M. Kabesch (2005). "G-protein-coupled receptor polymorphisms are associated with asthma in a large german population." Am J Respir Crit Care Med **171**: 1359-62.

Krapivinsky, G., M. Ackerman, E. Gordon, L. Krapivinsky and D. Clapham (1994). "molecular characterization of a swelling-induced chloride conductance regulatory protein, pICln." Cell **76**: 439-448.

Krapivinsky, G., W. Pu, K. Wickman, L. Krapivinsky and D. Clapham (1998). "pICln binds to a mammalian homolog of a yeast protein involved in regulation of cell morphology." The Journal of Biological Chemistry **273**: 10881-10814.

Kruse, S., S. Braun and K. Deichmann (2002). "Distinct signal transduction processes by IL-4 and IL-13 and influences from the Q551R variant of the human IL-4 receptor alpha chain." Respir Res **3**: 24.

Kruse, S., T. Japha, M. Tedner, S. Sparholt, J. Forster, J. Kuehr and K. Deichmann (1999). "The polymorphisms S503P and Q576R in the <interleukin-4-receptor alpha gene are associated with atopy and influence the signal transduction." Immunology **96**: 365-71.

Kurosawa, S., A. Myers, L. Chen, S. Wang, J. Ni, J. Plitt, N. Heller, B. Bochner and R. Schleimer (2003). "Expression of the Costimulatory Molecule B7-H2 (Inducible Costimulator Ligand) by Human Airway Epithelial Cells." Am J Respir Cell Mol Biol **28**: 563-573.

Laing, I., E. Eber, C. Hayden, P. Rye, N. Gibson, L. Palmer, P. Burton, J. Goldblatt and P. le Souef (1998a). "CC16: the A38G polymorphism is associated with airway responsiveness at one month and asthma at 6 years in children unselected for asthma (abstract)." Am J Respir Crit Care Med **157**: A857.

Laing, I., J. Goldblatt, E. Eber, C. Hayden, P. Rye, N. Gibson and e. al (1998b). "A polymorphism of the CC16 gene is associated with an increased risk of asthma." J Med Genet **35**: 463-7.

Laing, I., C. Hermans, A. Bernard, P. Burton, J. Goldblatt and P. le Souef (2000). "Association between plasma CC16 levels, the A38G polymorphism, and asthma." Am J Respir Crit Care Med **161**: 124-7.

Lang, F., G. Busch and H. Voelkl (1998). "The diversity of volume regulatory mechanisms." Cell Physiol Biochem **8**: 1-45.

Larkin, D., D. Murphy, D. Reilly, M. Cahill, E. Sattler, P. Harriott, D. Cahill and N. Moran (2004). "ICln, a novel Integrin alpha-IIb-beta3-associated protein, functionally regulated platelet activation." J Biol Chem **279**: 27286-27293.

Lazaar, A. and R. Panettieri (2005). "Airway smooth muscle: a modulator of airway remodeling in asthma." J Allergy Clin Immunol **116**: 488-495.

Lee, J., H. Park, S. Park, A. Jang, S. Uh, T. Rhim, C. Park, S. Hong, S. Holgate, J. Holloway and H. Shin (2004). "ADAM33 polymorphism: association with bronchial hyper-responsiveness in Korean asthmatics." Clin Exp Allergy **34**: 860-865.

Lemna, W., G. Feldman, B. Kerem, S. Fernbach, E. Zevkovich, W. O'Brien, J. Riordan, F. Collins, L. Tsui and A. Beaudet (1990). "Mutation analysis for heterozygote detection and the prenatal diagnosis of cystic fibrosis." N Engl J Med. **322**: 291-296.

Lenz, A., M. Schedel, M. Depner, B. Woitsch, S. Hara, M. Trinks, M. S. D. Kormann and M. Kabisch (2006). "Standard operating procedures of asthmagene.de."

Lesur, O., A. Bernard, K. Aarsalane and e. al (1995). "Clara Cell protein (CC16) induces a phospholipase A2-mediated inhibition of fibroblast migration in vitro." Am J Respir Crit Care Med **152**: 290-7.

- Leushner, J. (2001). "MALDI TOF mass spectrometry: an emerging platform for genomics and diagnostics." Expert Rev Mol Diagn **1**: 11-18.
- Levin, S., J. Butler, U. Schumacher, P. Wightman and A. Mukherjee (1986). "Uteroglobin inhibits phospholipase A2 activity." Life Sci **38**: 1813-9.
- Lin, Y., K. Wong and K. Calame (1997). "Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B-cell differentiation." Science **253**: 1550-1553.
- Little, D., A. Braun, M. O'Donnell and H. Koster (1997). "Mass spectrometry from miniaturized arrays for full comparative DNA analysis." Nat. Med. **3**: 1413-16.
- Lomardero, M. and A. Nieto (1981). "Glucocorticoid and development regulation of uteroglobin synthesis in rabbit lung." Biochem J **200**: 487-94.
- Lui, X., T. Beaty, P. Deindl, S. Huang, S. Lau, C. Sommerfeld, M. Fallin, W. Kao, U. Wahn and R. Nickel (2003). "Associations between total IgE levels and 6 potentially functional variants within the genes IL4, IL13 and IL4RA in german children: The german multicenter atopy study." J Allergy Clin Immunol **112**: 382-388.
- Mango, G., C. Johnston, S. Reynolds, J. Finkelstein, C. Plopper and B. Stripp (1998). "Clara cell secretory protein deficiency increases oxidant stress response in conducting airways." Am J Physiol **275**: L348-56.
- Mansur, A., A. Fryer, M. Hepple, R. Strange and M. Spiteri (2002). "An association study between the Clara cell secretory protein CC16 A38G polymorphism and asthma phenotypes." Clin Exp Allergy **32**: 994-999.
- Martinez, F., P. Graves, M. Baldini, S. Solomon and R. Erickson (1997). "Association between genetic polymorphisms in the beta2-adrenergic receptor and response to albuterol in children with and without a history of wheezing." J Clin Invest **100**: 3184-3188.
- Mattick, J. (1994). "Introns: evolution and function." Curr Opin Genet Dev **4**: 823-831.
- Mezzetti, M., M. Soloperto, A. Fasoli and S. Mattoli (1991). "Human bronchial epithelial cells modulate CD3 and mitogen-induced DNA synthesis in T cells but function poorly as antigen-presenting cells compared to pulmonary macrophages." J Allergy Clin Immunol **87**: 930-938.
- Miller, S., D. Dykes and H. Poletsky (1988). "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells." Nucleic Acid Res **16**: 1215.
- Mitsuyasu, H., Y. Yanagihara, X. Mao, P. Gao, Y. Arinobu, K. Ihara and e. al. (1999). "Cutting edge: Dominant effect of Ile50Val variant of the human IL-4 receptor alpha-chain in IgE synthesis." J Immunol **162**: 1227-1231.
- Mock, B., L. Liu, D. LePaslier and S. Huang (1996). "The B-lymphocyte maturation promoting transcription factor BLIMP1/PRDI-BF1 maps to D6S447 on human chromosome 6q21-q22.1 an the syntenic region of mouse chromosome 10." Genomics **37**: 24-28.
- Muntau, A. (1994). Pädiatrie.



- Musch, M., E. Davis-Amaral, H. Vandeburgh and L. Goldstein (1998). "Hypotonicity stimulates translocation of ICln in neonatal rat cardiac myocytes." Pflügers Arch.Eur. J. Physiol. **436**(415-422).
- Musch, M., C. Luer, E. Davis-Amaral and L. Goldstein (1997). "Hypotonic stress induces translocation of the osmolyte channel protein pICln in embryonic skate (*Raja eglanteria*) heart." J Exp Zool **277**: 460-463.
- Nagl, U., M. Erdel, F. Bergmann, B. Oehl, E. Scandella, L. Musante, L. Galletta, M. Gschwentner, J. Fürst, A. Schmarda, S. Hofer, G. Utermann, P. Deetjen and M. Paulmichl (1997). "Characterization of the human gene coding for the swelling-dependent chloride channel ICln at position 11q13.5-14.1 (CLNS1A) and further characterization of the chromosome 6 (CLNS1B) localization." Gene **209**: 59-63.
- Nagl, U., M. Erdel, A. Schmarda, M. Seri, G. Pinggera, M. Gschwentner, C. Duba, L. Galletta, P. Deetjen, G. Utermann and M. Paulmichl (1996). "Chromosomal Localization of the genes (CLNS1A and CLNS1B) coding for the swelling-dependent chloride channel ICln." Genomics **38**: 438-441.
- Noguchi, E., M. Shibasaki, T. Arimani, K. Takeda, Y. Yokouchi and T. Kawashima (1998). "Association of asthma and the interleukin-4 promoter gene in Japanese." Clin Exp Allergy **28**: 449-453.
- Nord, M., O. Andersson, M. Brönneberg and J. Lund (1992). "Rat lung polychlorinated biphenyl-binding protein: effect of glucocorticoids on the expression of the Clara cell-specific protein during fetal development." Arch Biochem Biophys **296**: 302-7.
- Ober, C., N. Cox, M. Abney, A. Di Rienzo, E. Lander, B. Changyaleket, H. Gidley, B. Kurtz, J. Lee, M. Nance, A. Pettersson, J. Prescott, A. Richardson, E. Schlenker, E. Summerhill, S. Willadsen, R. Parry and C. S. o. t. G. o. Asthma (1998). "Genome-wide search for asthma susceptibility loci in a founder population." Hum Mol Genet **7**: 1393-1398.
- Panettieri, R. (2002). "Airway smooth muscle: an immunomodulatory cell." J Allergy Clin Immunol **110**: 269-274.
- Papi, A., L. Stanciu, N. Papadopoulos, L. Teran, S. Holgate and S. Johnston (2000). "Rhinovirus infection induces major histocompatibility complex class I and costimulatory molecule upregulation on respiratory epithelial cells." J Infect Dis **181**: 1780-1784.
- Paulmichl, M., Y. Li, K. Wickman, M. Ackerman, E. Peralta and D. Clapham (1992). "New mammalian chloride channel identified by expression cloning." Nature **356**: 238-241.
- Paulmichl, M., A. Norris and D. Rainey (1995). "Role of chloride channel modulation in the mechanism of action of nedocromil sodium." Int. Arch Allergy Immunol **107**: 416.
- Pearce, N., J. Pekkanen and R. Beasley (1999). "How much asthma is really attributable to atopy?" Thorax **54**: 268-272.

Pfeuffer, I., S. Klein-Hessling, A. Heinfling, S. Chuvpilo, C. Escher, T. Brabletz, B. Heutsch, H. Schwarzenbach, P. Matthias and E. Serfling (1994). "Octamer factors exert a dual effect on IL-2 and IL-4 promoters." J Immunol **153**: 5572-85.

Pohunek, P., W. Roche, J. Tarzikova, J. Kurdmann and J. Warner (2000). "Eosinophilic inflammation in the bronchial mucosa in children with bronchial asthma." Eur Respir J **11(suppl25)**: 160.

Polito, A. and D. Proud (1997). Epithelial cells as inflammatory cells. In Asthma. New York, Raven Press.

Polito, A. and D. Proud (1998). "Epithelia cells as regulators of airway inflammation." J Allergy Clin Immunol **102**: 714-718.

Powell, R., J. Wicks, J. Holloway, S. Holgate and D. Davies (2004). "The splicing and fate of ADAM33 Transcripts in primary human airways fibroblasts." Am J Respir Cell Mol Biol **31**: 13-21.

Primakoff, P. and D. Myles (2000). "The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity." Trends Genet **16**: 83-87.

Probst, S., R. Denson, E. Rothstein, K. Estell and L. Schwiebert (2000). "Proinflammatory and Th2-derived cytokines modulate CD40-mediated expression of inflammatory mediators in airway epithelia: implications for the role of epithelial CD40 in airway inflammation." J Immunol **165**: 2214-2221.

Pu, W., G. Krapivinsky, L. Krapivinsky and D. Clapham (1999). "pICln inhibits snRNP biogenesis by binding core spliceosomal proteins." Mol Cell Biol **19**: 4113-4120.

Pu, W., K. Wickman and D. Clapham (2000). "ICln is essential for cellular and early embryonic viability." The Journal of Biological Chemistry **275**: 12363-12366.

Pusch, W., J. Wurmbach, H. Thiele and M. Kostrzewa (2002). "MALDI-TOF mass spectrometry-based SNP genotyping." Pharmacogenomics **3**: 537-48.

Raby, B., E. Silverman, D. Kwiatkowski, C. Lange, R. Lazarus and S. Weiss (2004). "ADAM33 polymorphisms and phenotype associations in childhood asthma." J Allergy Clin Immunol **113**: 1071-1078.

Reihnsaus, E., M. Innis, N. MacIntyre and S. Liggett (1993). "Mutations in the gene encoding the beta2-adrenergic receptor in normal and asthmatic subjects." Am J Respir Cell Mol Biol **8**: 334-339.

Ren, B., K. Chee, T. Kim and T. Maniatis (1999). "PRDI-BF1/Blimp-1 repression is mediated by corepressors of the Groucho family of proteins." Genes Dev. **13**: 125-137.

Riede, U.-N. and H.-E. Schaefer (1999). Allgemeine und spezielle Pathologie.

Riordan, J., J. Rommens, I. Kerem, M. Drumm, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelcza, J. Zielinski, S. Lok, N. Pavsic, J. Chou, L. Drumm, C. Iannuzzi, F. Collins and L. Tsui (1989).

- "Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA." Science **245**: 1066-1073.
- Ritter, M., A. Ravasio, M. Jakab, S. Chwatal, J. Fürst, A. Laich, M. Gschwentner, S. Signorelli, C. Burtscher, S. Eichmüller and M. Paulmichl (2003). "Cell swelling stimulates cytosol to membrane transposition of ICln." The Journal of Biological Chemistry **278**: 50163-50174.
- Robinson, D. (2000). "TH-2 cytokines in allergic disease." British Medical Bulletin **56**: 956-968.
- Romagnani, S. (1992). "Human TH1 and TH2 subsets: regulation of differentiation and role in protection and immunopathology." Int. Arch Allergy Immunol **98**: 279-285.
- Romanet-Manent, S., D. Charpin, A. Magnan, A. Lanteaume, D. Vervloet and E. C. Group (2002). "Allergic vs nonallergic asthma: what makes the difference?" Allergy **57**: 607-613.
- Rosenwasser, L., D. Klemm, J. Dresback, H. Inamura, J. Mascali and M. Klennert (1995). "Promotorpolymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy." Clin Exp Allergy **25 (suppl 2)**: 74-78, discussion 95-96.
- Sanchez-Olea, R., F. Emma, M. Coghlan and K. Strange (1998). "Characterization of pICln phosphorylation state and a pICln-associated protein kinase." Biochimica et Biophysica Acta **1381**: 49-60.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**: 5463-67.
- Sasieni, P. (1997). "From genotypes to genes: doubling the sample size." Biometrics **53**: 1253-1261.
- Scandella, E., U. Nagl, B. Oehl, F. Bergmann, M. Gschwentner, J. Fürst, A. Schmarda, M. Ritter, S. Waldegger, F. Lang, P. Deetjen and M. Paulmichl (2000). "The promoter for constitutive expression of the human ICln gene CLNS1A." The Journal of Biological Chemistry **275**: 15613-15620.
- Schafer, T., J. Heinrich, M. Wjst and e. al (1999). "Association between severity of atopic eczema and degree of sensitization to aeroallergens in schoolchildren." J Allergy Clin Immunol **104**: 1280-1284.
- Schwartz, R., A. Rybicki and R. Nagel (1997). "Molecular cloning and expression of a chloride channel-associated protein pICln in human young red blood cells: association with actin." Biochem J **327**: 609-616.
- Schwiebert, L., C. Stellato and R. Schleimer (1996). "The epithelium as a target of glucocorticoid action in the treatment of asthma." Am J Respir Crit Care Med **154**(16-20).
- Sengler, C., A. Heinzmann, S. Jerkic, A. Haider, C. Sommerfeld, B. Niggemann, S. Lau, J. Forster, A. Schuster, W. Kamin, C. Bauer, I. Laing, P. le Souef, U. Wahn, K. Deichmann and R. Nickel (2003). "Clara cell protein 16 (CC16) gene polymorphism influences the degree of airway responsiveness in asthmatic children." J Allergy Clin Immunol **111**: 515-19.

- Shijubo, N., Y. Itoh, T. Yamaguchi and e. al (1999). "Serum levels of Clara cell 10 kDa protein are decreased in patients with asthma." Lung **177**: 45-52.
- Shirakawa, T., K. Deichmann, K. Izuhara, X. Mao, C. Adra and J. Hopkin (2000). "Atopy and asthma: genetic variants of IL-4 and IL-13 signalling." Trends Immunology today **21**: 60-64.
- Skadhauge, L., K. Christensen, K. Kyvik and T. Sigsgaard (1999). "Genetic and environmental influence on asthma: a population based study of 11688 Danish twin pairs." Eur Respir J **13**: 8-14.
- Speer, C. and M. Gahr (2001). Pädiatrie.
- Standiford, T., S. Kunkel, M. Basha, S. Chensue, J. Lynch, G. Toews, J. Westwich and R. Strieter (1990). "Interleukin-8 gene expression by a pulmonary cell line: a model for cytokine networks in the lung." J Clin Invest **86**: 1945-1953.
- Stein, R., C. Holberg, W. Morgan, A. Wright, E. Lombardi, L. Taussig and F. Martinez (1997). "Peak flow variability, methacholine responsiveness and atopy markers for detecting different wheezing phenotypes in childhood." Thorax **52**: 946-952.
- Stellato, C., L. Beck, G. Gorgone, D. Proud, T. Schall, S. Ono, L. Lichtenstein and R. Schleimer (1995). "Expression of the chemokine RANTES by a human bronchial epithelial cell line: Modulation by cytokines and glucocorticoids." J Immunol **155**: 410-418.
- Storm, N., B. Darnhofer-Patel, V. d. BD and C. Rodi (2003). "MALDI-TOF mass spectrometry-based SNP genotyping." Methods Mol Biol **212**: 241-62.
- Striz, I., T. Mio, Y. Adachi, P. Heires, R. Robbins, J. Spurzem, M. Illing, D. Romberger and S. Rennard (1999). "IL-4 induces ICAM-1 expression in human bronchial epithelial cells and potentiates TNF-alpha." Am J Physiol **21**: L58.
- Summerhill, E., S. Leavitt, H. Gidley, R. Parry, J. Solway and C. Ober (2000). "Beta2-adrenergic Receptor Arg16/Arg16 genotype is associated with reduced lung function, but not with asthma in the Hutterites." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine **162**: 599-602.
- Suzuki, I., E. Yamaguchi, N. Hizawa, A. Itoh and Y. Kawakami (1999). "A new polymorphism in the 5' flanking region of the interleukin (IL)-4 gene." Immunogenetics **49**: 738-739.
- Tanaka, K., H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida and T. Matsuo (1988). "Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry." Rapid Commun. Mass Spectrom. **2**(8): 151-153.
- Tang, C. and T. Tang (1998). "The 30-kD domain of protein 4.1 mediates its binding to the carboxyl terminus of pICln, a protein involved in cellular volume regulation." Blood **92**: 1442-1447.
- Tariverdian, G. and W. Buselmaier (2004). "Humangenetik." **3**: 240-241.

Turner, C. J., D. Mack and M. Davies (1994). "Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells." Cell **77**: 297-306.

van der Pouw Kraan, T., A. van Veen, L. Boeije, S. van Tuyl, E. de Groot, S. Stapel, A. Bakker, V. CL, L. Aarden and J. van der Zee (1999). "An IL-13 promoter polymorphism associated with increased risk of allergic asthma." Genes Immun **1**: 61-65.

Van Eerdewegh, P., R. Little, J. Dupuis, R. Del Mastro, K. Falls, J. Simon, D. Torrey, S. Padit, J. McKenry, K. Braunschweiger, A. Walsh, Z. Liu, B. Hayward, C. Folz, S. Manning, A. Bawa, L. Saracino, M. Thackston, Y. Bencheikroun, N. Capparelli, M. Wang, R. Adair, Y. Feng, J. Dubois, M. FitzGerald, H. Huang, R. Gibson, K. Allen, A. Pedan, M. Danzig, S. Umland, R. Egan, F. Cuss, S. Rorke, J. Clough, J. Holloway, S. Holgate and T. Keith (2002). "Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness." Nature **418**: 426-430.

Vollmer, W., L. McCamant, L. Johnson and A. Buist (1990). "Long-term reproducibility of tests of small airways function." Chest **98**: 303-307.

Von Mutius, E., Martinez FD, Fritsch C, Nikolai T, Roell G, Thiemann HH (1994). "Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany." Am J Respir Crit Care Med **149**: 358-364.

Von Mutius, E., S. K. Weiland, C. Fritsch, H. Duhme and U. Keil (1998). "Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany." The Lancet **351**: 862-866.

Walegger, S. and T. Jentsch (2000). "From tonus to tonicity: physiology of CLC chloride channels." J Am Soc Nephrol **11**: 1331-1339.

Walley, A. and W. Cookson (1996). "Investigation of an interleukin-4 promoter polymorphism for associations with asthma and atopy." J Med Genet **33**: 689-692.

Wang, H., C. Shelburne, J. Zamorano, A. Kelly, J. Ryan and A. Keegan (1999). "Cutting edge: Effects of an allergy-associated mutation in the IL-4R alpha (Q576R) on human IL-4-induced signal transduction." J Immunol **162**: 4385-4389.

Wang, X., B. Moylan, D. Leopold and e. al (2000). "Mutation in the gene responsible for cystic fibrosis and predisposition to chronic rhinosinusitis in the general population." Jama **284**: 1814-1819.

Weiland, S. K., B. Björkstén, B. Brunekreef, W. O. C. Cookson, E. von Mutius, D. P. Strachan and I. s. o. A. a. A. i. C. P. I. S. Group (2004). "Phase II of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC II): rationale and methods." Eur Respir J **24**: 406-412.

Weiland, S. K., E. Von Mutius, T. Hirsch, H. Duhme, C. Fritsch, B. Werner, A. Husing, M. Stender, H. Renz, W. Leupold and U. Keil (1999). "Prevalence of respiratory and atopic disorders among children in the East and West Germany five years after unification." Eur Respir J **14**: 862-870.

Werner, M., N. Herbon, H. Gohlke, J. Altmüller, M. Knapp, J. Heinrich and M. Wjst (2004). "Asthma is associated with single-nucleotide polymorphisms in ADAM33." Clin Exp Allergy **34**: 26-31.

Wills-Karp, M. (2004). "Interleukin-13 in asthma pathogenesis." Immunological Reviews **202**: 175-190?

Wills-Karp, M., J. Luyimbazi, X. Xu, B. Schofield, T. Neben, C. Karp and D. Donaldson (1998). "Interleukin-13: central mediator of allergic asthma." Science **282**: 2258-2261.

Woitsch, B., D. Carr, D. Stachel, I. Schmid, S. K. Weiland, C. Fritzsche, E. Von Mutius and M. Kabesch (2004). "A comprehensive analysis of interleukin-4 receptor polymorphism and their association with atopy and IgE regulation in childhood." Int, Arch Allergy Immunol **135**: 319-324.

Wu, X., A. Di Rienzo and C. Ober (2001). "A population genetics study of single nucleotide polymorphisms in the interleukin 4 receptor alpha (IL4Ralpha) gene." Genes Immun **2**: 128-134.

Zhang, L., X. Cui, K. Schmitt, R. Hubert, W. Navidi and N. Arnheim (1992). "Whole genome amplification from a single cell: Implications for genetic analysis." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**: 5847-5851.

Zurawski, S., F. J. Vega, B. Huyghe and G. Zurawski (1993). "Receptors for interleukin-13 and interleukin-4 are complex and share a novel component that functions in signal transduction." EMBO J **12**: 2263-2270.

## 9 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Komponenten eines PCR-Ansatzes.....	43
Tabelle 2: Allgemeine Temperaturbedingungen einer PCR .....	43
Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Primerpaare und deren PCR-Bedingungen .....	44
für die long-Fragment-PCR.....	44
Tabelle 4: Allgemeine Temperaturbedingungen für die long-fragment-PCR.....	44
Tabelle 5: Der Standard-PEP-Ansatz.....	46
Tabelle 6: Allgemeine Temperaturbedingungen für die PEP-Reaktion.....	46
Tabelle 7: Übersicht über alle verwendeten Primerpaare, deren Sequenz, .....	
Fragmentlänge, Annealing- Temperatur, Zyklen-Zahl, verwendeter .....	
Puffer und eventuelle Zusätze .....	49
Tabelle 8: Verwendete Sequenzierprimer .....	50
Tabelle 9: Allgemeine Temperaturbedingungen für die Sequenzierreaktionen.....	51
Tabelle 10: PCR für die hME-Methode .....	55
Tabelle 11: Verwendete Sense-, Antisense- und hME-Primer .....	55
Tabelle 12: Temperaturbedingungen für die PCR .....	56
Tabelle 13: SAP-Reaktion-Mastermix .....	57
Tabelle 14: Temperaturbedingungen für die SAP-Reaktion.....	57
Tabelle 15: PCR der Primer-Extension-Reaktion.....	58
Tabelle 16: Temperaturbedingungen für Primer-Extension-Reaktion.....	58
Tabelle 17: Übersicht über genotypisierte SNPs und die jeweils verwendete Population.....	71
Tabelle 18: Übersicht der identifizierte SNPs im CLNS1A-Gen .....	72
Tabelle 19: Test auf Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE) .....	73
Tabelle 20: Assoziationen zwischen untersuchten SNPs und Asthma (BHR) .....	
in der Fall-Kontroll- und Querschnittspopulation.....	74
Tabelle 21: Assoziationen zwischen untersuchten SNPs und bronchialer .....	
Hyperreaktivität (BHR) in der Fall-Kontroll-Population.....	74
Tabelle 22: Assoziation zwischen untersuchten SNPs und Heuschnupfen .....	
in der Fall-Kontroll- und Querschnittspopulation.....	75
Tabelle 23: Assoziationen zwischen untersuchten SNPs und Neurodermitis .....	
in der Fall-Kontroll- und Querschnittspopulation. ....	76
Tabelle 24: Assoziationen zwischen untersuchten SNPs und Atopie .....	
in der Fall-Kontroll- und Querschnittspopulation.....	77
Tabelle 25: Übersicht der Lungenfunktionsparameter für C7624T.....	79
Tabelle 26: Übersicht der Lungenfunktionsparameter; Berechnung .....	
nach rezessivem Modell .....	80
Tabelle 27: Lungenfunktionsergebnisse für den SNP C7624T: .....	
getrennt nach Fällen und Kontrollen.....	80
Tabelle 28: Übersicht der Lungenfunktionsparameter für C7453T.....	81
Tabelle 29: Übersicht der Lungenfunktionsparameter für T12777G.....	82
Tabelle 30: Allelspezifisches Bindeverhalten von Transkriptionsfaktoren .....	86

## **10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1: Die phänotypische Heterogenität der Atopie (nach FEIJEN et al.).....	2
Abbildung 2: Erscheinungsformen des Giemens in Abhängigkeit vom Alter ..... (nach STEIN et al.).....	4
Abbildung 3: Spirogramm. Schematische Darstellung der Lungenfunktionsparameter:..... (aus ZIMMERMANN, Atemwegserkrankungen im Kindesalter) .....	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Fluss-Volumen-Diagramms. .... (aus ZIMMERMANN, Atemwegserkrankungen im Kindesalter) .....	8
Abbildung 5: Auslösung und Pathophysiologie des Asthmaanfalls ..... (aus SPEER, GAHR, Pädiatrie).....	10
Abbildung 6: IgE-Produktion: Regulation durch Zytokine ..... (aus GREVERS, RÖCKEN: Taschenatlas der Allergologie) .....	11
Abbildung 7: Pathogenese Asthma bronchiale: Die Interaktion zwischen ..... Th2-Inflammation und pulmonalen Epithel vor dem Hintergrund ..... der Gen-Umwelt-Interaktion (modifiziert nach DAVIES et al.).....	13
Abbildung 8: Struktur des möglichen Modells eines I <sub>CLn</sub> Homo Dimers und ..... schematisches Modell eines I <sub>CLn</sub> Monomers nach FÜRST et al. ....	28
Abbildung 9: Aminosäuresequenz von I <sub>CLn</sub> und deren funktionelle Domänen ..... (nach FÜRST et al./ LARKIN et al.).....	29
Abbildung 10: Schematischer Aufbau eines MALDI-TOF-Massenspektrometers ..... (nach GRIFFIN and SMITH 2000) .....	53
Abbildung 11: Kontrollschema .....	53
Abbildung 12: Verteilungsmuster von vier Mutterplatten (96er Platten) ..... auf eine Tochterplatte (384er Platte) .....	54
Abbildung 13: Schematischer Ablauf der hME-Methode .....	60
Abbildung 14: Schematische Darstellung des CLNS1A-Gens mit ..... Intron- und Exonbereichen. ....	65
Abbildung 15: Fragmentkarte für die sequenzierten Bereiche im CLNS1A-Gen.....	66
Abbildung 16: Schematische Darstellung des CLNS1A-Gens mit identifizierten SNPs .....	66
Abbildung 17: Kopplungskarte (Linkage Map).....	68
Abbildung 18: Graphische Darstellung des Linkage Disequilibrium; .....	70
Abbildung 19: Schematische Darstellung des CLNS1A-Gens mit ..... den zur Genotypisierung ausgewählten SNPs.....	71
Abbildung 20: Graphische Darstellung der Vista-Browser-Analyse .....	84



## 11 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADAM	A disintegrin and metalloprotease
ATP	Adenosintriphosphat
AZT	Azidothymidin
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BHR	Bronchiale Hyperreaktivität
Bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
cAMP	Cyclo-Adenosinmonophosphat
CC16	Clara cell
cGMP	Cyclo-Guanosinmonophosphat
CLNS1A	Chlorid channel nucleotide sensitive
cm	Centimeter
CMV	Zytomegalie-Virus
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	Dideoxynukleosidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid (Äthylendiamintetraessigsäure)
ERV	Expiratorisches Reservevolumen
EVC	Expiratorische Vitalkapazität
FEV1	Forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde
FRC	Funktionelle Residualkapazität
FVC	Forcierte Vitalkapazität
Fwd	Forward
g	Formelzeichen für die Erdbeschleunigung, Gravitationskonstante ( $g=9,81 \text{ m/s}^2$ )
hME	Homogeneous-Mass-Extent

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

IC	Inspiratorische Kapazität
ISSAC	International study of asthma and allergies in childhood
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITP	Inosintriposphat
IVC	Inspiratorische Vitalkapazität
JAK	Januskinase
Kb	Kilobasen
LD	Linkage Disequilibrium
LOD	Log of the odds
M	Molar
MALDI-TOF	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight
Mb	Megabasen
MDL	München-Dresden-Leipzig (Name der Fall-Kontroll-Population)
MEF25/50/75	Maximaler expiratorischer Fluss bei 25/50/75% der Vitalkapazität
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mV	Millivolt
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
NK	Negativkontrolle
OD260/OD280	Quotient der Extinktionen zur Bestimmung der Reinheit von DNA-Lösungen
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEF	Expiratorischer Spitzenfluss
PEP	Primer extension preamplification
Rev	Reverse
RSV	Respiratory Syncytal Virus
rcf	relative Zentrifugalkraft

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

RV	Residualvolumen
RVD	Regulated volume decrease
SAP	Shrimp alkaline phosphatase
sec	Sekunde
SNP	Single nucleotide polymorphism
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TF	Transkriptionsfaktor
TH-1-Zellen	T-Helferzellen des Typs 1
TH-2-Zellen	T-Helferzellen des Typs 2
TLC	Totale Lungenkapazität
U	Unit
UK	United Kingdom
US	United States
UTR	Untranslated region
UV	Ultraviolett
VC	Vitalkapazität
VT	Atemzugvolumen
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar

### 12 DANKSAGUNG

Für die Übernahme der vorliegenden Dissertation an der medizinischen Fakultät der LMU sowie für die Überlassung des Themas und die Betreuung bedanke ich mich vielmals bei Herrn PD Dr. med. M. Kabesch.

Für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Forschungszentrum „Kubus“ des Dr. von Haunerschen Kinderspitals danke ich Herrn Prof. Dr. med. D. Reinhardt.

Insgesamt möchte ich der gesamte Arbeitsgruppe für Allergogenetik meinen Dank aussprechen. An dieser Stelle sind insbesondere Frau M. Schedel, Herrn M. Kormann und Herr Dr. rer. nat. W. Peters für ihre freundliche und zuverlässige Unterstützung zu nennen.

Für die immer tatkräftige Hilfe bei der technischen Durchführung danke ich Frau I. Dahmen und Frau A. Pleiss, sowie Herrn Dr. rer. nat. N. Klopp von der GSF-Forschungszentrum für Natur und Umwelt. Danken möchte ich mich auch Fr. S. Harabacz für die nette Zusammenarbeit und den motivierenden Austausch und allen Mit-Doktoranden für das angenehme Arbeitsklima im Labor.

Für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung danke ich außerdem Herrn M. Depner.

Ein großer Dank gilt auch meiner Familie und meinen Freunden, die mich bis zum Schluss auf vielerlei Weise unterstützend begleitet haben. Auch wenn ich hier viele Namen nicht mehr aufführen könnte, möchte ich doch Herrn Dr. med. vet. K. Pieper sowie meine Freunde Frau N. Kratzer, Frau S. Markl und Frau C. Höfler namentlich nennen.

### 13 LEBENS LAUF

Name:	Anna Pieper, geb. Lenz	
Geburtsdatum, -ort:	18.09.1979, Neuss	
Nationalität:	deutsch	
Schulbildung:	1986 – 1990	Görresschule, Neuss
	1990 – 1999	Nelly-Sachs-Gymnasium, Neuss
Studium:	1999 – 2006	Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
	14.12.2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	03.01.2006	Approbation als Ärztin
Beruflicher Werdegang:	2005 – 2006	Anfertigung der Dissertation am Dr. von Haunerschen Kinderspital, Klinikum der Universität München
	Seit Februar 2006	Klinik für Anästhesiologie, Klinikum der Universität München